

Aus dem Institut für klinische Neuroimmunologie  
Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Vorstand: Prof. Dr. med. Martin Kerschensteiner

# **Charakterisierung von T-Zellen und T-Zell-Rezeptoren bei entzündlichen neurologischen Erkrankungen**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

**Michaela Amft**

aus  
München

2021

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München**

Berichterstatter : Prof. Dr. med. Reinhard Hohlfeld

Mitberichterstatter : PD Dr. Astrid Blaschek  
apl. Prof. Dr. rer. nat. Gerhild Wildner

Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter: PD Dr. rer. nat. Klaus Dornmair

Dekan : Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 25.02.2021

# Zusammenfassung

T-Zellen sind wichtige Bestandteile des Immunsystems. Sie dienen der Verteidigung des Organismus gegen diverse Angreifer und werden durch ihre hypervariablen T-Zell-Rezeptoren charakterisiert, die sie in die Lage versetzen, strukturell vielfältige Antigene zu erkennen und zu bekämpfen. Sie erhalten immer mehr Aufmerksamkeit, da ihnen eine Schlüsselrolle in einer Reihe von Autoimmunerkrankungen zugesprochen wird.

Insbesondere CD8<sup>+</sup>-T-Zellen geraten in den letzten Jahren zunehmend in den Fokus der Wissenschaft. Bei manchen Krankheiten ist die genaue Funktion dieser Zellen noch unverstanden, so zum Beispiel bei der ZNS-Erkrankung Multiple Sklerose, von der weltweit Millionen Menschen betroffen sind. Die Pathogenese der Multiplen Sklerose hat vermutlich einen autoimmunen Hintergrund. Auch bei anderen entzündlichen ZNS-Erkrankungen wie Autoimmunenzephalitiden sind T-Zellen beteiligt, jedoch ist auch hier die exakte Funktion der Zellen noch ungeklärt.

In dieser Dissertation wurde die Rolle von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen sowohl bei der MS als auch den Autoimmunenzephalitiden untersucht.

Zum einen sollte eine spezielle Population von CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>-CD94<sup>+</sup> Zellen in Hirnproben eines MS-Patienten genauer charakterisiert werden, um mehr über ihre Bedeutung für die Erkrankung herauszufinden. Es gibt Hinweise darauf, dass MS unter anderem durch eine Dysfunktion von regulatorischen Zellen geprägt sein könnte. Im Rahmen dieser Arbeit konnten Daten erhoben werden, die die CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>-CD94<sup>+</sup> Zellen als T-Zellen identifizierten. Zudem legen sie nahe, dass bestimmte NK-Zelloberflächenproteine, die NKG2-Moleküle, bei der Feinsteuerung von möglicherweise regulatorisch tätigen T-Zellen beteiligt sind. Diese Zellen könnten eine entscheidende Rolle im Verlauf der Erkrankung spielen. Ihre Hemmung durch spezielle Subtypen der NKG2-Familie ist möglicherweise für Exazerbationen mit verantwortlich und würde somit einen Angriffspunkt für neue Medikamente bieten.

Zum anderen wurde mithilfe verschiedener Techniken nach dem Antigen eines CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Klons isoliert aus dem Gehirn eines Patienten mit GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Enzephalitis gesucht. Mithilfe der in der Arbeitsgruppe Dornmair entwickelten Antigen-Suchtechnik mittels Plasmid-kodierter kombinatorischer Peptidbibliotheken konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem Antigen am ehesten um ein 8er Peptid handelt. Diese Ergebnisse ermöglichen nun eine zielgenaue und effiziente Suche nach dem aktivierenden Antigen. Durch das Aufdecken des Antigens wird ein vertieftes Verständnis für die Vorgänge bei derartigen Autoimmunphänomenen geschaffen werden.



# Danksagung

Ich bedanke mich bei allen, die mich bei der Entstehung dieser Doktorarbeit begleitet haben.

Zunächst danke ich meinem Betreuer PD Dr. Klaus Dornmair, der gewillt war, einen Mediziner in seiner Arbeitsgruppe zu beherbergen und mir die interessanten Fragestellungen dieser Arbeit anvertraut hat. Er hatte jederzeit ein offenes Ohr bei Fragen und lieferte immer neue Ideen. Die Gespräche waren stets eine Bereicherung.

Weiterer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Reinhard Hohlfeld, der mich so freundlich unterstützt hat.

Bei Prof. Dr. Kerschensteiner möchte ich mich stellvertretend für die Infrastruktur am Biomedizinischen Zentrum der LMU bedanken, in dessen Räumen und mit dessen Equipment diese Arbeit entstanden ist.

Dann möchte ich mich bei meiner gesamten Arbeitsgruppe bedanken, vor allem auch bei Joachim für die Einweisung in die vielen unterschiedlichen Geräte und Techniken und die Teilhabe an seiner jahrelangen Erfahrung.

Danke an Geraldine, Marga und Qingqing für die Kooperation bei Experimenten und für Euer stets offenes Ohr bei Fragen. Danke an Matea und Edu für die tolle Zusammenarbeit bei vielen Projekten und die Bereitschaft jederzeit Fragen zu beantworten und Sachverhalte zu diskutieren. Danke an Julia, Bella und Reini für Eure Unterstützung und an alle anderen für die gute Stimmung und das motivierende Arbeitsklima im Labor.

Danke an Stephan und Willi für die vielen Gespräche in der Zellkultur.

Danke an meine Familie und Freunde für Eure Geduld.

### Abkürzungsverzeichnis

Ak: Antikörper  
Amp: Ampicillin  
APC: Allophycocyanin  
APC: „antigen presenting cell“  
APZ: antigenpräsentierende Zelle(n)  
bp: „base pairs“  
BSA: bovines Serumalbumin  
CD: „cluster of differentiation“  
cDNA: „complementary desoxyribonucleic acid“  
CDR: „complementary-determining region(s)“  
CSF: Cerebrospinalflüssigkeit  
CSRP2: „cystein and serine rich protein 2“  
C-terminal: carboxy-terminal  
DAPI: 4',6-Diamidin-2-phenylindol  
DEPC: Diethylpyrocarbonat  
DNA: „desoxyribonucleic acid“  
dNTP Desoxynukleosidtriphosphat  
DTT: Dithiothreitol  
EAE: „experimental autoimmune encephalitis“  
EB: „Elution Buffer“  
E. coli: Escherichia coli  
EDTA: Ethylendiamintetraacetat  
ELISA: „enzyme-linked immunosorbent assay“  
FACS: „fluorescence-activated cell sorting“  
FCS: fetales Kälberserum  
FITC: Fluoresceinisothiocyanat  
for: „forward“  
FSC: „forward angle light scatter“  
g: mittlere Erdbeschleunigung  
GABA: Gamma-Amino-Buttersäure  
GABA<sub>A</sub>R: Gamma-Amino-Buttersäure-A Rezeptor  
HLA: humanes Leukozytenantigen  
Ig: Immunglobulin  
IP2: Indexpatient 2  
IP2-8S1: expandierte T-Zellklon von IP2  
ITAM: „immunoreceptor tyrosine-based activating motifs“  
LCL: „lymphoblastoid cell line“  
LCM: „Laser Capture Microdissection“  
LMD: Lasermikrodissektion  
MAIT: „mucosal-associated T-cell“  
MBP: „myelin basic protein“  
MHC: „major histocompatibility complex“  
MOG: „myelin oligodendrocyte glycoprotein“

mRNA: „messenger ribonucleic acid“  
MR1: „MHC related protein 1“  
MS: Multiple Sklerose  
NC: Negativkontrolle(n)  
NFAT: „nuclear factor of activated t-cells“  
NGS: „next generation sequencing“  
NMDA: N-Methyl-D-Aspartat  
N-terminal: amino-terminal  
OKB: oligoklonale Banden  
PBS: „phosphate-buffered saline“, Phosphat-gepufferte Salzlösung  
PCR: „polymerase chain reaction“  
PECPL: „plasmid encoded combinatorial peptide library“  
PI: Propidiumiodid  
PLP: „proteolipid protein“  
prim.: primärer  
rev: „reverse“  
RNA: „ribonucleic acid“  
rpm: „revolutions per minute“  
RPMI: „Roswell Park Memorial Institute“  
RT: Raumtemperatur  
RT: reverse Transkription  
sek.: sekundärer  
(s)GFP: „(super) green fluorescent protein“  
SSC: „side angle light scatter“  
Taq: thermus aquaticus  
TBE: TRIS-Borat-EDTA-Puffer  
TCR: „T-cell receptor“  
TSO: „template switching oligo“  
TZR: T-Zell-Rezeptor(en)  
UV: ultraviolett  
ZNS: zentrales Nervensystem



# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b>	<b>iii</b>
<b>Danksagung</b>	<b>v</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>vi</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Immunsystem</b>	<b>1</b>
1.1.1 Allgemeine Funktionsweisen und Bestandteile des Immunsystems	1
1.1.2 Rolle und Funktion von T-Zellen im Immunsystem	1
1.1.3 T-Zell-Rezeptor-Komplex, humane Leukozytenantigene und Antigenerkennung durch T-Zellen	2
1.1.4 Autoimmunerkrankungen	6
1.1.4.1 Neurologische Autoimmunerkrankungen	6
1.1.4.1.1 Paraneoplastische neurologische Erkrankungen und Autoimmunenzephalitiden	7
1.1.4.1.1.1 Anti-GABA <sub>A</sub> -Enzephalitis	8
1.1.4.1.1.1.1 Indexpatient 2	10
1.1.4.1.2 Multiple Sklerose	10
1.1.4.1.2.1 Rolle von speziellen T-Zell-Subpopulationen und NK-Zellen bei MS	12
1.1.4.1.2.2 Patient A	14
<b>1.2 Antigensuche</b>	<b>15</b>
1.2.1 Techniken zur Identifizierung von T-Zell-Antigenen	15
1.2.2 Technik der unvoreingenommenen Antigen-Identifizierung mit Plasmid- kodierten kombinatorischen Peptidbibliotheken (PECPL)	17
<b>1.3 Zielsetzung</b>	<b>19</b>
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>21</b>
<b>2.1 Material</b>	<b>21</b>
2.1.1 Geräte und Laborausstattung	21
2.1.2 Chemikalien, Puffer, Medien und Zusätze sowie andere Verbrauchsmaterialien	22
2.1.3 Zelllinien	23
2.1.3.1 Eukaryotische Linien	24
2.1.3.2 E. coli	24
2.1.4 PCR-Materialien und verwendete Primer	24
2.1.5 Software	26
2.1.6 Antikörper	26
2.1.7 Verwendete Plasmide	28
2.1.8 Kits und Reagenzien	28
2.1.9 Patientenmaterial und Gewebeproben	29
2.1.9.1 Patient A	29



2.1.9.2	Indexpatient 2	29
2.1.9.2.1	Krankheitsverlauf	29
2.1.9.2.2	Entstehung des Klons IP2-8S1 und HLA-Bestimmung	29
<b>2.2</b>	<b>Mikrobiologische Methoden</b>	<b>30</b>
2.2.1	Transformation E. coli	30
2.2.1.1	Hitzeschock	30
2.2.1.2	Elektroporation	30
<b>2.3</b>	<b>Zellkultur basierte Methoden</b>	<b>31</b>
2.3.1	Kulturbedingungen	31
2.3.2	Einfrieren und Auftauen von eukaryotischen Zellen	31
2.3.3	Selektion	32
2.3.4	Subkultivierung von adhärenenten Zellen und Suspensionszellen	32
2.3.5	Zellzahlbestimmung mit der Neubauer-Zählkammer	33
2.3.6	Transfektion von Zellen zur transienten Proteinexpression	33
2.3.6.1	FuGENE®	33
2.3.6.2	Nukleofektion	33
2.3.6.2.1	COS-7 Zellen	33
2.3.6.2.2	LCL-Zellen	34
2.3.7	Ansätze zur Aktivierung von T- Hybridomzellen	34
2.3.7.1	CD3-Aktivierung	34
2.3.7.2	Aktivierung durch antigenpräsentierende Zellen	35
2.3.7.2.1	LCL-Zellen als antigenpräsentierende Zellen	35
2.3.7.2.1.1	Endogene Peptide und EBV-Antigene	35
2.3.7.2.1.2	CSRP2 und $\alpha_1$ -GABA-A-Rezeptor	36
2.3.7.2.2	COS-7 Zellen als antigenpräsentierende Zellen	36
2.3.7.2.2.1	PECP-Bibliotheken und erste Runde Isolierung	36
2.3.7.2.2.2	Suche nach Reaktivierung und zweite Runde Isolierung	38
2.3.7.2.2.3	Suche nach Reaktivierung in gepoolten Proben	38
2.3.7.2.2.4	Kandidatenpeptide	38
2.3.8	Nachweismöglichkeiten der Aktivierung von T-Hybridomzellen	39
2.3.8.1	IL2-ELISA	39
2.3.8.2	Fluoreszenzmikroskopie mittels NFAT-sGFP	39
2.3.8.3	Durchflusszytometrie mittels NFAT-sGFP	39
2.3.9	Isolierung von antigenpräsentierenden Zellen mittels Mikromanipulator	39
2.3.10	Methoden zur Verringerung der Spontanaktivierung	40
2.3.10.1	Reklonierung IP2 Klon 11	40
2.3.10.2	Untersuchungen zu autoaktivierten T-Hybridomen	40
<b>2.4</b>	<b>Immunologische Methoden</b>	<b>41</b>
2.4.1	Durchflusszytometrie	41
2.4.1.1	Allgemeiner Ablauf und Vorbereitung der Proben	41
2.4.1.2	Färbungen	41
2.4.1.3	Kontrolle der GFP-Expression	42

2.4.1.4	Isolierung von verschiedenen Zellpopulationen mit BD <i>FACSaria™ Fusion</i>	42
2.4.2	Immunhistochemie	42
2.4.2.1	Färbung von CD94 und CD8 $\alpha$ in Hirnschnitten	42
2.4.2.2	Isolierung von Zellen mittels Lasermikrodissektion	44
<b>2.5</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b>	<b>45</b>
2.5.1	RNA Isolierung	45
2.5.2	DNA Isolierung und Weiterverarbeitung	45
2.5.2.1	Agarose-Gelelektrophorese	45
2.5.2.2	DNA Extraktion aus Agarose-Gelen	45
2.5.2.3	Isolierung von Plasmid-DNA aus E. coli	46
2.5.3	Bestimmung der DNA und RNA Konzentration via <i>NanoDrop™</i>	46
2.5.4	Weiterverarbeitung von RNA und DNA	46
2.5.4.1	RT - Reverse Transkription	46
2.5.4.2	PCR - Polymerase-Ketten-Reaktion	47
2.5.4.3	Multiplex-RT-PCR	47
2.5.4.4	Semi-nested PCR und zusätzliche Zyklen	49
2.5.4.5	Probenvorbereitung für <i>next generation sequencing</i>	51
2.5.4.6	Einzelzell-PCR zur Vervielfältigung der PECP-Kopien aus isolierten APZ	53
2.5.4.7	Nested PCR	53
2.5.4.8	Verarbeitung von Proben zur Retransfektion	54
2.5.4.9	PCR Aufreinigung und Topo-Ligation	54
2.5.4.10	DNA Präzipitation	54
2.5.5	Sequenzierung und Sequenzanalyse	55
2.5.6	NGS Datenanalyse	55
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>56</b>
<b>3.1</b>	<b>Charakterisierung von T-Zell-Populationen in Hirnbiopsien</b>	<b>56</b>
3.1.1	Färbung von CD94 und CD8 $\alpha$	56
3.1.2	Isolierung von Zellen mittels LCM	58
3.1.3	Charakterisierung von CD94 <sup>+</sup> -CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> Zellen	58
3.1.3.1	Primervalidierung an Tonsillen RNA	58
3.1.3.2	Anwendung der Primer an RNA aus verschiedenen Hirnregionen	59
3.1.3.2.1	Vergleich von Genexpressionsmustern in verschiedenen MS-Läsionen	59
3.1.3.3	Analyse von LCM isolierten CD94 <sup>+</sup> -CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> Zellen im Vergleich zu CD94 <sup>-</sup> -CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> Zellen	60
3.1.3.3.1	Ergebnisse der Analyse mit ausgewählten Primern	60
3.1.3.3.2	NGS Analysen	61
<b>3.2</b>	<b>Antigensuche für den T-Zellklon IP2-8S1</b>	<b>61</b>
3.2.1	Charakterisierung von IP2 TZR Transfektanten	61

3.2.1.1	Vergleich der CD8 und CD3 Expression sowie Aktivierbarkeit von IP2 Klonen	61
3.2.1.1.1	CD3-Aktivierung dreier IP2 Klone	61
3.2.1.1.2	CD3 und CD8 Expression dreier IP2 Klone im Vergleich	61
3.2.1.1.3	Bedeutung von CD3-Aktivierung und Färbung von CD3 und CD8 bei weiterführenden Experimenten	62
3.2.1.2	Methoden zur Verringerung der Spontanaktivierung von IP2-8S1 Hybridomzellen und Untersuchung der Ursachen	63
3.2.1.2.1	Reklonierung IP2 Klon 11	63
3.2.1.2.2	Untersuchungen zu spontanaktiven T-Hybridomen mittels Transkriptomanalyse	68
3.2.2	Aktivierung durch antigenpräsentierende Zellen	70
3.2.2.1	Voruntersuchungen zu Transfektionsbedingungen der antigenpräsentierenden Zellen	70
3.2.2.1.1	Vergleich der Transfektionseffizienz von FuGENE® und Nucleofector bei COS-7 Zellen	70
3.2.2.1.2	Transfektionseffizienz verschiedener Lösungen, Programme und Vektoren bei LCL-Zellen im Vergleich	71
3.2.2.1.2.1	Nukleofektion mit SG und SF Lösung und allgemeine Bedingungen	71
3.2.2.1.2.2	sGFP-Expression in LCL-Zellen nach Transfektion mittels RSV bzw. ptt5 Vektor	72
3.2.2.2	LCL-Zellen als antigenpräsentierende Zellen	74
3.2.2.2.1	Suche nach endogener Aktivierung	74
3.2.2.2.2	CSRP2 und $\alpha_1$ -GABA <sub>A</sub> -Rezeptor	75
3.2.2.3	COS-7 Zellen als antigenpräsentierende Zellen	76
3.2.2.3.1	COS-7 Zellen mit PECP-Bibliotheken (N24 und N27)	76
3.2.2.3.1.1	Erste Runde Isolierung von APZ	78
3.2.2.3.1.2	Reaktivierung und zweite Runde Isolierung	79
3.2.2.3.1.3	Reaktivierung in gepoolten Proben	80
3.2.2.3.2	COS-7 Zellen mit Kandidatenpeptiden	80
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>83</b>
<b>4.1</b>	<b>Autoimmunerkrankung MS - Rolle der Unterscheidung von Aggressoren, Regulatoren und unbeteiligten Zuschauern</b>	<b>83</b>
4.1.1	CD94 <sup>+</sup> -CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> Zellen im Vergleich mit CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> -CD94 <sup>+</sup> Zellen	83
4.1.2	Primeroptimierung	83
4.1.3	NGS Ergebnisse der Zellpools und Folgerungen	84
4.1.4	Genexpression in verschiedenen Hirnregionen von Patient A und Folgerungen für die Rolle von CD94 <sup>+</sup> -CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> -T-Zellen	85
4.1.5	Zusammenfassende Bewertung der Ergebnisse und mögliche Rolle der untersuchten Zellen in der Erkrankung	87
<b>4.2</b>	<b>Suche nach dem Antigen von T-Zell Klon IP2-8S1</b>	<b>89</b>

4.2.1	Nukleofektion als Transfektionsmethode	90
4.2.2	Untersuchung von Kandidatenantigenen von Klon IP2-8S1	90
4.2.3	Bedeutung der Spontanaktivierung	92
4.2.4	Rolle der HLA-Restriktion	93
4.2.5	Hinweise auf die entscheidende Rolle der Länge der PECP-Bibliothek	93
4.2.6	Limitationen bei Verwendung der unvoreingenommenen Methode mittels PECP-Bibliotheken	94
<b>4.3</b>	<b>Ausblick</b>	<b>95</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>		<b>98</b>
<b>Anhang</b>		<b>108</b>
	Ergänzende Tabellen	108
	Auflistung von Abbildungen und Tabellen	109
<b>Eidesstattliche Versicherung</b>		<b>112</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Immunsystem

### 1.1.1 Allgemeine Funktionsweisen und Bestandteile des Immunsystems

Die Aufgabe des menschlichen Immunsystems besteht darin, den Körper gegen mikrobielle Gefahren, aber auch gegen körpereigene Neoplasien zu verteidigen. Es besteht aus zwei großen Teilen: dem angeborenen, unspezifischen Immunsystem und dem erworbenen, adaptiven Immunsystem. Das angeborene Immunsystem ermöglicht eine schnelle Antwort auf Gefahren für den Organismus. Das adaptive Immunsystem stellt dagegen eine differenziertere Reaktion dar, die erst mit Anlaufzeit aktiv werden kann.

Zum angeborenen Immunsystem gehört der Schutz vor Mikroorganismen durch mechanische Barrieren wie der Haut. Bakterizide Peptide auf der Körperoberfläche vergrößern den Schutzeffekt weiter. Eine zusätzliche Barriere für pathogene Eindringlinge bilden die Schleimhäute der Atemwege und des Gastrointestinaltraktes. Im Schleim selbst finden sich darüber hinaus Defensine, Lysozym sowie Lactoferrin - Stoffe, die auf verschiedene Art der Abwehr von Mikroorganismen dienen. Gelingt es Mikroorganismen dennoch, in den Körper einzudringen, werden andere Verteidigungsmaßnahmen wie das Komplementsystem aktiviert. Auch Zellen gehören zur ersten Linie der Verteidigung im Rahmen des angeborenen Immunsystems, so z. B. Makrophagen, Granulozyten sowie Natürliche Killerzellen (NK-Zellen). Unter anderem über *Toll-like* und *Scavenger*-Rezeptoren können diese Zellen typische mikrobielle Muster und Strukturen erkennen (sogenannte PAMPs, *Pathogen associated molecular Patterns*).

Das adaptive Immunsystem teilt sich in einen humoralen und einen zellulären Anteil. Es wird hauptsächlich durch zwei Zelllinien repräsentiert: die B- und T-Lymphozyten. Im Gegensatz zur schnellen angeborenen Abwehr, die dafür aber relativ unspezifisch ist, entstehen bei der gezielten, adaptiven Abwehr für einzelne Pathogene spezifische Zellen und Antikörper. Dies dauert zwar zunächst länger, führt im Verlauf aber zur Bildung eines Gedächtnisses über sogenannte überdauernde Gedächtniszellen und unter Umständen zu einer Immunität, die weitere Infektionen mit demselben Erreger verhindern kann. Auf dem Prinzip der Gedächtnisbildung beruht auch die Methode des aktiven Impfens.

Sowohl T- als auch B-Zellen entwickeln sich aus den gleichen Vorläuferzellen. Die Vorläufer der T-Zellen verlassen zur weiteren Reifung allerdings das Knochenmark und migrieren in den Thymus.

B-Zellen erfüllen ihre Rolle, indem sie Antigene direkt erkennen und in der Folge spezifische Antikörper bilden, die zu einer Neutralisierung der Pathogene führen, oder indem sie über andere Wege wie dem Zusammenspiel mit dem Komplementsystem die Gefahr bannen können.

### 1.1.2 Rolle und Funktion von T-Zellen im Immunsystem

Während die B-Zellen also hauptsächlich der Bildung von löslichen Antikörpern sowie zusätzlich als antigenpräsentierende Zellen dienen, beruht die Wirkung der T-Zellen auf mehreren zellvermittelten Säulen. Allgemein werden hierbei CD4<sup>+</sup>- von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen unterschieden.

Die sogenannten *Cluster of Differentiation*, kurz CD, können zur Unterscheidung von zytotoxischen CD8<sup>+</sup>-Effektor-T-Zellen und den CD4<sup>+</sup>-T-Helferzellen verwendet werden und sind an der Aktivierung

der Zellen als sogenannte Korezeptoren beteiligt. T-Helferzellen sind essentiell für die Reifung der B-Zellen (Th2-Helferzellen) und von Makrophagen (Th1-Helferzellen) und erfüllen je nach Subtyp viele weitere Rollen. In den letzten Jahren und Jahrzehnten wurden immer mehr Subgruppen wie z. B. Th17-Zellen entdeckt. (Guery and Hugues, 2015)

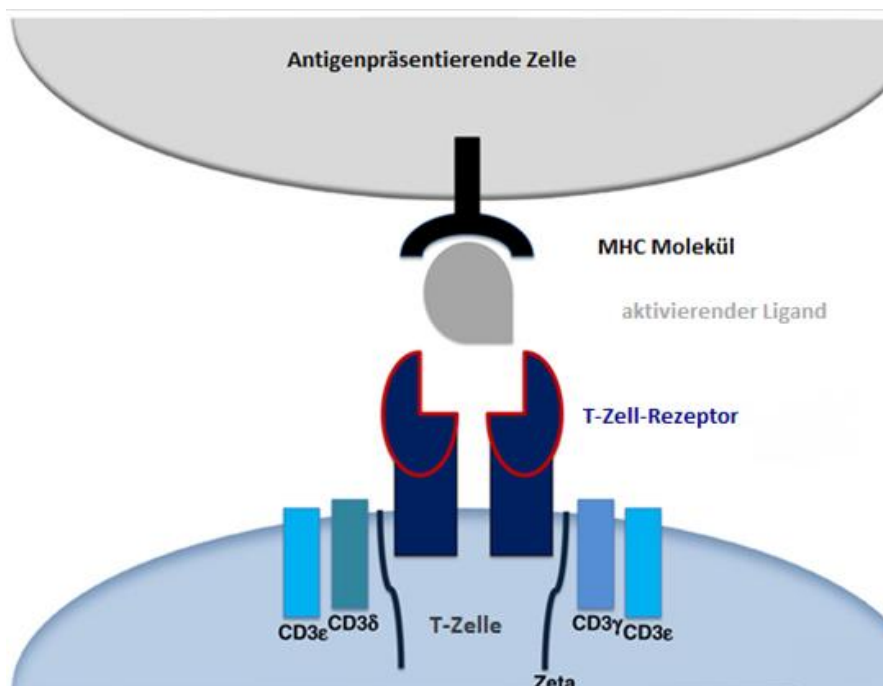
Die zytotoxischen CD8<sup>+</sup>-Effektor-T-Zellen dagegen greifen ihre Zielzellen (z. B. virusinfizierte Zellen) direkt an und zerstören sie. Dies kann zum einen über Perforin und Granzym geschehen, zum anderen über den Fas-Liganden.

Im Gegensatz zu B-Zellen können T-Zellen Antigene nicht direkt erkennen. Sie benötigen hierfür vorgeschaltete, sogenannte antigenpräsentierende Zellen (kurz APZ), die ihnen Epitope der prozessierten Antigene auf bestimmten Oberflächenmolekülen, den MHC- (*major histocompatibility complex*) bzw. HLA-Molekülen (humane Leukozytenantigene), präsentieren.

### 1.1.3 T-Zell-Rezeptor-Komplex, humane Leukozytenantigene und Antigenerkennung durch T-Zellen

Die Antigenerkennung durch T-Zellen erfolgt durch den T-Zell-Rezeptor, der sich auf der Oberfläche der T-Zellen befindet. Er interagiert mit dem MHC-Molekül anderer Zellen, das ein antigenes Peptid gebunden hat, das als fremd erkannt wird, und so eine Immunreaktion auslöst.

Der T-Zell-Rezeptor ist ähnlich wie ein Antikörper aufgebaut und besteht aus einer  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette mit jeweils einer variablen und einer konstanten Region. Er ist in der Zellmembran verankert und mit weiteren Molekülen wie den CD3 Molekülen und der Zeta-Kette gekoppelt (siehe Abbildung 1), die zusammen den TZR-Komplex bilden und der Weiterleitung eines Signals ins Zellinnere dienen. (Bronstein-Sitton et al., 1999; Clambey et al., 2014; Clevers et al., 1988; van der Merwe and Dushek, 2011; Weaver, 2017; Weiss, 1991)



**Abbildung 1: Darstellung der Interaktion einer APZ mit einer T-Zelle über den MHC-Peptid-Komplex und den TZR.** Der TZR besteht aus einer  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette und bildet zusammen mit assoziierte Molekülen wie der Zeta-Kette und den CD3 Molekülen den TZR-Komplex. Dieser interagiert mit einer APZ über den MHC-Peptid-Komplex. Zeta=Zeta-Kette. Modifiziert nach Clambey et al., 2014.

Der T-Zell-Rezeptor entsteht nach somatischer Rekombination durch Paarung je einer  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette im Thymus. Zudem gibt es vereinzelt  $\gamma/\delta$  TZR.

Die variable Region kann durch die sogenannte somatische Rekombination verschiedener Gensegmente (der V (Variablen), J (*Joining*), und bei der  $\beta$ -Kette zusätzlich der D (Diversen) Regionen) eine unglaubliche Anzahl verschiedener Formen annehmen. Hinzu kommt das Einfügen oder Deletieren von Nukleotiden an den Verbindungsstücken, was zu weiterer Diversität führt. (Clambey et al., 2014; Davis and Bjorkman, 1988) Die höchste Vielfalt ist in den CDR (*complementary determining regions*) des TZR gebündelt, über die auch später der hauptsächliche Kontakt mit dem Antigen-MHC-Komplex stattfindet. Die CDR1 und 2 interagieren dabei mit den MHC-Molekülen, die CDR3 dagegen mit dem MHC-gebundenen Peptid. (Clambey et al., 2014; Sharma and Holt, 2014)

Durch die Kopplung mit einer zweiten, ebenso variablen ( $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -) Kette wird die Vielfalt an möglichen T-Zell-Rezeptoren weiter vergrößert. (Clambey et al., 2014) Das T-Zell-Rezeptorrepertoire soll so aus über  $10^{15}$  theoretisch möglichen verschiedenen T-Zell-Rezeptoren bestehen. (Nikolich-Zugich et al., 2004) Allerdings wird hiervon nur ein Teil tatsächlich auf peripheren T-Zellen exprimiert, da wenige T-Zellen die Reifung im Thymus überstehen. (siehe unten) Eine Studie geht demnach von einer Diversität von  $\alpha/\beta$ -TZR von mindestens etwa  $25 \times 10^6$  möglichen unterschiedlichen Rezeptoren im Blut aus. (Arstila et al., 1999)

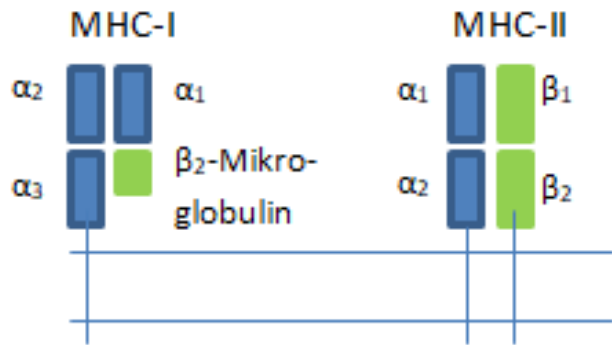
Im Thymus wird durch positive und negative Selektion der entstandenen TZR-Varianten sichergestellt, dass nur Zellen, die über ihren TZR MHC-Peptid-Komplexe erkennen können (positive Selektion), aber keine zu starke Affinität zu den präsentierten Komplexen haben (negative Selektion), in die Peripherie freigesetzt werden. (Clambey et al., 2014) Im Rahmen dieses Vorgangs werden über 95 % der entstandenen Zellen aussortiert. (Nossal, 1994) So soll auch die Bildung autoreaktiver T-Zell-Klone verhindert werden.

Die T-Zellen besitzen auf ihrer Oberfläche den jeweiligen T-Zell-Rezeptor sowie die Membranproteine CD4 oder CD8. Diese Membranproteine binden zusätzlich zum TZR an MHC-I- (im Fall von CD8) bzw. MHC-II-Komplexe (bei CD4) und spielen somit eine große Rolle durch die sogenannte MHC-Restriktion. (Clambey et al., 2014) Der für diese Arbeit relevantere CD8-Korezeptor findet sich in der Form eines durch eine Disulfidbindung verbundenen Heterodimers aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette auf etwa 90 % der zytotoxischen T-Zellen. (Cole et al., 2012; Norment and Littman, 1988; Weaver, 2017)

Daneben finden sich CD8-Moleküle auch auf einer Reihe weiterer Zellen (Moebius et al., 1991) wie dendritischen Zellen (Winkel et al., 1994), NK-Zellen (Moebius et al., 1991; Perussia et al., 1983) und Monozyten. (Gibbins et al., 2007). Teilweise kommt es auch zur Ausbildung von CD8  $\alpha/\alpha$ -Homodimeren (Cole et al., 2012), so z. B. auf  $\gamma/\delta$ -T-Zellen, NK-Zellen (Moebius et al., 1991) oder auch MAIT-Zellen. (Bulitta et al., 2018; Martin et al., 2009)

Die Funktion dieser Membranproteine ist vielfältig (Cole et al., 2012), unter anderem stabilisieren die CD8-Moleküle die Bindung zwischen Antigen-MHC-Komplex und TZR. (Wooldridge et al., 2005)

Bei den MHC-Molekülen gibt es zwei Unterformen. MHC-I-Moleküle kommen auf nahezu allen Zellen vor, MHC-II-Moleküle dagegen nur auf einigen APZ. Der Aufbau der beiden Moleküle ist in Abbildung 2 dargestellt.



**Abbildung 2: Schematischer Aufbau der beiden MHC-Proteine.** MHC-Klasse-I-Proteine bestehen aus einer membranverankerten  $\alpha$ -Kette und einem  $\beta_2$ -Mikroglobulin. MHC-Klasse-II-Proteine bestehen aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette, die beide in der Membran gebunden sind. (Weaver, 2017) Adaptiert nach Wieczorek et al., 2017.

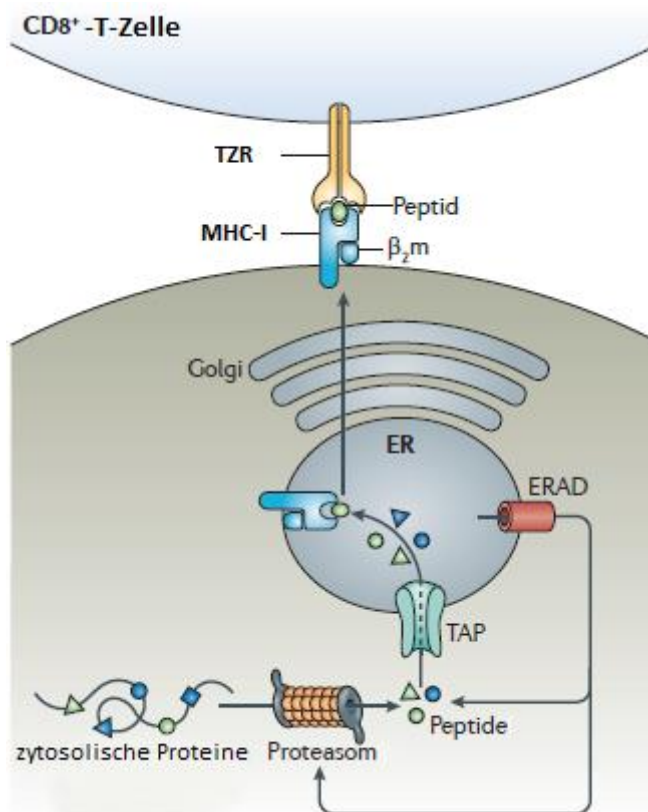
MHC-Klasse-I-Proteine setzen sich aus einer membranverankerten  $\alpha$ -Kette und einem  $\beta_2$ -Mikroglobulin zusammen, MHC-Klasse-II-Proteine aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette. (Weaver, 2017) Für die  $\alpha$ -Kette des MHC-I-Moleküls kodieren drei Gene, somit gibt es HLA-A, HLA-B und HLA-C. Zudem gibt es auch eine Reihe nicht klassischer MHC-Moleküle wie HLA-E. (siehe 1.1.4.1.2.1) Auch für die MHC-II  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kettenpaare gibt es drei Genausprägungen, die in den Kombinationen HLA-DR, HLA-DP und HLA-DQ resultieren. (Blum et al., 2013; Weaver, 2017).

Die menschlichen MHC-Gene sind reich an Polymorphismen. (Blum et al., 2013) Die Expression von MHC-Allelen ist kodominant (Weaver, 2017), sodass sich für MHC-I bei heterozygoten Individuen sechs verschiedene HLA-Klasse-I-Moleküle finden lassen.

Diese HLA-Moleküle sind essentiell für die Antigenerkennung durch T-Zellen. Dabei handelt es sich um einen komplexen Prozess.

Die beteiligten Zellen stellen an ihrer Zelloberfläche über besagte MHC-I- oder MHC-II-Moleküle prozessierte Antigene zur Schau, die so von T-Zellen erkannt werden können. Die Prozessierung der Antigene unterscheidet sich nach deren Ursprung. Für intrazelluläre Erreger sowie andere zytosolische Proteine findet sie im Proteasom statt, bevor die Fragmente im Endoplasmatischen Retikulum (ER) auf MHC-I-Proteine geladen werden (Blum et al., 2013) und an die Zelloberfläche gelangen. (siehe Abbildung 3) (Weaver, 2017) Hierdurch können infizierte und entartete Zellen an den präsentierten Peptiden erkannt werden. (Blum et al., 2013) Von außen durch Phagozytose aufgenommene Erreger werden in Phagolysosomen verdaut und die Fragmente dort auf MHC-Klasse-II-Proteine gebunden. Vergleichbar verläuft der Weg nach Endozytose. (Blum et al., 2013) Die MHC-I-Antigen-Komplexe werden dann von  $CD8^+$ -T-Zellen erkannt, die MHC-II-Antigen-Komplexe von  $CD4^+$ -T-Zellen. (Blum et al., 2013) Durch Paarung mit einem passenden Antigen-MHC-Komplex werden die T-Zellen aktiviert und reifen zu T-Helfer-Zellen ( $CD4^+$ -T-Zellen) oder zu zytotoxischen T-Zellen ( $CD8^+$ -T-Zellen). Nach Aktivierung sezernieren aktivierte T-Zellen verschiedene Interleukine wie IL-2. Zytotoxische T-Zellen triggern nach Aktivierung auf verschiedenen Wegen die Initiation der Apoptose der virusinfizierten oder entarteten Zielzelle. (Weaver, 2017)





**Abbildung 3: Darstellung der Antigenpräsentation über das MHC-I-Molekül.** Zytosolische Proteine werden im Proteasom zerkleinert und im ER (Endoplasmatisches Retikulum) auf MHC-I-Moleküle geladen, über die die Antigenerkennung durch zytotoxische T-Zellen (CD8<sup>+</sup>-T-Zellen) auf der Zelloberfläche erfolgt. Die Aufnahme der Peptide in das ER erfolgt über den Antigenpeptid-Transporter TAP (*transporter associated with antigen presentation*). ERAD=ER-associated protein degradation. (Neeffes et al., 2011) Modifiziert nach Neeffes et al., 2011.

Für diese Arbeit, in der hauptsächlich CD8<sup>+</sup>-T-Zellen untersucht wurden, spielt die spezielle Bindung zwischen dem MHC-I-Komplex und diesen T-Zellen eine bedeutende Rolle.

Peptide, die den CD8<sup>+</sup>-T-Zellen durch ein MHC-Molekül präsentiert werden, sind in der Regel zwischen 8 und 10 Aminosäuren lang. (Burrows et al., 2006; Wenzel et al., 1994) Jedoch können auch längere Fragmente gebunden werden. (Probst-Kepper et al., 2001) Diese stehen teils am Carboxy-Ende über die Bindungstasche hinaus oder werden noch durch Exopeptidasen auf die entsprechende Länge gekürzt. (Collins et al., 1994; Weaver, 2017) Alternativ können sie sich in der Mitte aus der Bindungstasche hervorwölben. (Guo et al., 1992)

Die Bindung des Peptides an das MHC-Molekül wird in der Regel durch Interaktionen zwischen dem freien Amino- und Carboxy-Ende des Peptides und der Bindungsfurche des MHC-Moleküls aufrechterhalten. (Weaver, 2017) Für einige MHC-I-Moleküle wurden sogenannte *Anchor-Residues* (Burrows et al., 2006) eruiert, also Aminosäuren, die, wenn in einem Peptid an bestimmter Stelle enthalten, bevorzugt von speziellen MHC-Molekülen gebunden werden. (Weaver, 2017)

Es wurde zwar gezeigt, dass TZR präsentierte Peptide einer definierten Länge eindeutig bevorzugen (Ekeruche-Makinde et al., 2013), aber auch, dass TZR nicht nur ein Antigen binden und somit polyspezifisch sind. Für einen TZR wurde nun gezeigt, dass er wohl über eine Millionen Peptide erkennen könnte. (Wooldridge et al., 2012) Dies scheint nötig zu sein, um das Repertoire möglicher Antigene abzudecken. (Mason, 1998)

Ebenso kann es aber zur Kreuzreaktivität zwischen von T-Zellen (oder auch von Antikörpern) erkannten mikrobiellen Strukturen und körpereigenen Strukturen kommen. Dieser Mechanismus der molekularen Mimikry könnte ein wichtiger Punkt in der Entstehung von Autoimmunerkrankungen wie MS sein. (Oldstone, 1987, 2014; Wucherpfennig and Strominger, 1995)

Neben den bereits genannten Unterklassen gibt es zusätzlich spezielle T-Zell-Subpopulation wie die oben schon genannten  $\gamma/\delta$ -T-Zellen, MAIT-T-Zellen (*mucosal associated invariant T-cells*) oder aber auch NK-T-Zellen, deren Rollen in verschiedenen Erkrankungen und deren Behandlungsmöglichkeiten Gegenstand aktueller Forschung sind. (Held et al., 2015; Lawand et al., 2017; Mallevaey et al., 2011; Wun et al., 2011) Diese Subpopulationen zeichnen sich durch die Expression von bestimmten TZR aus und können nicht-Peptid-Antigene (Lipide, Vitamin B Produkte) im Kontext von nicht klassischen bzw. MHC ähnlichen Molekülen wie CD1d (NK-T-Zellen) oder MR1 (MAIT-Zellen) erkennen. (Godfrey et al., 2010; Kjer-Nielsen et al., 2012; Mallevaey et al., 2011; Tilloy et al., 1999; Treiner et al., 2003; Young et al., 2013) Auch posttranslational modifizierte Peptide können von T-Zellen erkannt werden. (Herzog et al., 2005) So wird das Spektrum möglicher TZR-Zielstrukturen weiter vergrößert.

Das enorme Bindungsspektrum, das durch T-Zellen abgedeckt wird, ist einerseits essentiell, um Abwehrmöglichkeiten gegen alle erdenklichen pathogenen Antigene zu besitzen, andererseits besteht dadurch aber die Möglichkeit der Entstehung von Autoimmunität. (Mason, 1998)

### **1.1.4 Autoimmunerkrankungen**

Trotz der unter 1.1.3 geschilderten und auch weiteren Maßnahmen der sogenannten zentralen (für T-Zellen im Thymus stattfindend) und auch peripheren Toleranzinduktion (z. B. Induktion von Anergie), kommt es vor, dass T-Zell-Klone und B-Zellen überdauern, die körpereigene Strukturen fehlerhaft als fremd oder feindlich erkennen und in der Folge angreifen. Dies kann der Beginn von Autoimmunerkrankungen sein. Solche Erkrankungen können systemisch oder auf ein Organsystem beschränkt sein.

Bekannte Beispiele für auf ein Organsystem beschränkte Erkrankungen sind z. B. die Hashimoto-Thyreoiditis und der Typ-1-Diabetes, in deren Rahmen die Schilddrüse bzw. das Pankreas vom Immunsystem angegriffen wird. (Weaver, 2017) Systemisch finden sich Erkrankungen wie der systemische Lupus erythematoses und die Sklerodermie.

An vielen Erkrankungen sind sowohl autoreaktive T-Zellen als auch Autoantikörper beteiligt. Auch vor dem Nervensystem machen solche Erkrankungen nicht halt, obwohl dieses unter physiologischen Bedingungen einen zusätzlichen Schutz durch die Blut-Hirn-Schranke besitzt. (Weaver, 2017)

#### **1.1.4.1 Neurologische Autoimmunerkrankungen**

Zwei als Autoimmunerkrankungen des Nervensystems angesehene Erkrankungen, die im Rahmen dieser Dissertation untersucht wurden, sind zum einen Autoimmunenzephalitiden und zum anderen die Multiple Sklerose. Ein weiteres Beispiel für eine neurologische Autoimmunerkrankung ist die Myasthenia gravis. Hierbei beeinträchtigen Autoantikörper die acetylcholinerge Transmission an der motorischen Endplatte und führen so zu den klassischen Symptomen der muskulären Ermüdbarkeit und Schwäche. (Weaver, 2017)

#### 1.1.4.1.1 Paraneoplastische neurologische Erkrankungen und Autoimmunenzephalitiden

Eine Gehirnentzündung, die durch das eigene Immunsystem unterhalten wird, wird auch Autoimmunenzephalitis genannt. Diese äußert sich oft mit subakuten neurologischen Symptomen wie Gedächtnis- und Kognitionsstörungen bis hin zum Koma. (Lancaster, 2016) Es kommt u. a. zu epileptischen Anfällen, psychiatrischen Symptomen wie Psychosen, Impulskontrollstörungen und Aggression, sowie Bewegungsstörungen. (Lancaster, 2016) Sie von anderen Formen der Enzephalitis oder primär psychischen Erkrankungen abzugrenzen, ist bisweilen schwer. (Lancaster, 2016; Schou et al., 2016)

Bei den Autoimmunenzephalitiden gibt es verschiedene relevante Untertypen.

Ein Teil der Autoimmunenzephalitiden ist paraneoplastischen Ursprungs. (Graus and Dalmau, 2012) Als paraneoplastisch werden Erkrankungen bezeichnet, die im Rahmen einer Tumorerkrankung auftreten, aber nicht durch direkte Tumoreinwirkung erklärt werden können. (Dalmau and Rosenfeld, 2008) Sie kommen entweder durch vom Tumor sekretierte Botenstoffe zustande (z. B. SIADH=*syndrome of inappropriate antidiuretic hormone secretion* (Kanaji et al., 2014; Pelosof and Gerber, 2010)) oder durch Antikörper, die gegen das Tumorgewebe gebildet werden, jedoch zusätzliche Wirkungen durch Kreuzreaktivität entfalten. (Pelosof and Gerber, 2010) Teilweise werden die paraneoplastischen Symptome vor der Tumordiagnose offensichtlich (Pelosof and Gerber, 2010) und sollten somit Grund und Hilfestellung für eine sorgfältige Primäriussuche darstellen. (Nath and Grant, 1997)

Paraneoplastische neurologische Erkrankungen entstehen eben durch oben genannte Kreuzreaktivität von Antikörpern gegen Tumorgewebe (Leypoldt and Wandinger, 2014; Pelosof and Gerber, 2010), welches neuronale Proteine exprimieren kann. (Darnell, 1996) Die Antikörper kreuzreagieren mit intrazellulären (nukleären und zytoplasmatischen) ZNS Bestandteilen oder Oberflächenproteinen des ZNS. (Graus and Dalmau, 2012; Lancaster and Dalmau, 2012) Bekannte paraneoplastische neurologische Erkrankungen sind z. B. das Opsoklonus-Myoklonus-Syndrom, das Lambert-Eaton-Syndrom und eine Reihe weiterer Erkrankungen. (Graus and Dalmau, 2012)

Durch die genannten Mechanismen kann es schließlich auch zur Entstehung einer Enzephalitis kommen, also einer Entzündung des Gehirns, wie sie ebenso bei der Infektion mit Viren (z. B. Herpes-Simplex-Viren) vorkommt. (Lancaster, 2016)

Unterschieden werden wie bereits angesprochen die paraneoplastischen Formen, bei denen v. a. Antikörper gegen intrazelluläre Antigene (wie Anti-Hu, Anti-Yo) die Krankheit kennzeichnen (sogenannte onkoneurale Antikörper), von Formen, bei denen die Antikörper gegen Oberflächenstrukturen oder synaptische Proteine wie z. B. Rezeptoren oder Ionenkanäle gerichtet sind. (Lancaster, 2016; Lancaster and Dalmau, 2012)

Erstere sind in der Regel mit Tumoren assoziiert und die Rolle von T-Zellen in dem Angriff auf die Neurone wird diskutiert, wohingegen die Antikörper selbst wohl nicht pathogen sind. (Dalmau and Rosenfeld, 2008; Lancaster, 2016; Lancaster and Dalmau, 2012)

Letztere haben keine derart konsistenten Tumorbeziehungen (Lancaster, 2016), können aber ebenfalls mit Tumoren assoziiert sein. (Spatola et al., 2017) Je nach vorhandenem Antikörper besteht zum Teil auch hier ein Malignomrisiko, dem nachgegangen werden sollte. So liegt bei der Anti-GABA<sub>B</sub>-Rezeptor-Enzephalitis in etwa der Hälfte der Fälle ein kleinzelliges Bronchialkarzinom vor. Die Anti-NMDA-Rezeptor-Enzephalitis ist dagegen bei Frauen im gebärfähigen Alter oft mit einem ovariellen Teratom vergesellschaftet. (Lancaster, 2016) Seit der Entdeckung der Anti-NMDA-Rezeptor-

Enzephalitis wächst die Gruppe der Autoimmunenzephalitiden mit Antikörpern gegen neuronale Oberflächenstrukturen stetig. (Newman et al., 2016; Panzer and Lyons, 2016) Die Antikörper hierbei werden als pathogen angesehen und für reversible Störungen der Neurone verantwortlich gemacht. (Lancaster, 2016)

Zusätzlich gibt es eine Gruppe von Autoimmunenzephalitiden mit Antikörpern gegen intrazelluläre synaptische Proteine und weitere weniger gut erforschte Autoimmunenzephalitiden. (Lancaster, 2016; Lancaster and Dalmau, 2012)

Neben Tumoren werden auch Infektionen als auslösende Faktoren von Autoimmunenzephalitiden diskutiert. (Guan et al., 2016; Spatola et al., 2017)

Die Behandlung richtet sich nach der Form der Erkrankung und umfasst im Allgemeinen immunmodulierende und immunsuppressive Therapien wie Steroide, intravenöse Immunglobuline, Plasmapherese oder als *Second-line* Therapie auch Rituximab und Cyclophosphamid. (Lancaster, 2016; Newman et al., 2016) Zusätzlich wird bei Bedarf eine antiepileptische Therapie und wenn möglich die Tumorentfernung durchgeführt. (Newman et al., 2016; Petit-Pedrol et al., 2014) Bei therapierefraktären Verläufen kann unter Umständen eine *Third-line* Therapie mit Tocilizumab (einem monoklonalen Anti-IL-6-Ak) erwogen werden. (Lee et al., 2016)

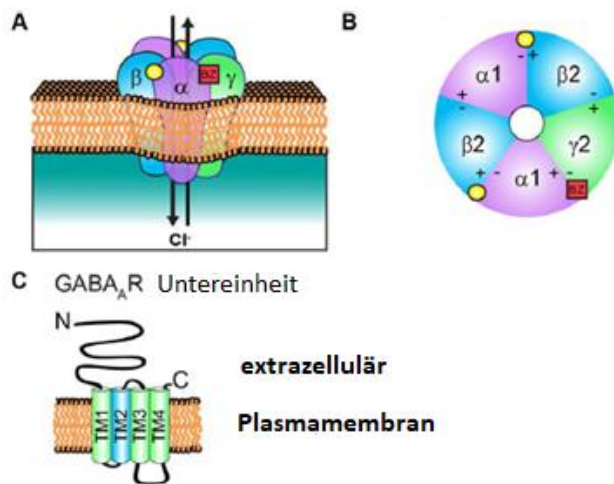
Die Behandlungserfolge bei Erkrankungen mit Antikörpern gegen Oberflächenproteine sind oft besser, wohingegen die Behandlung bei Erkrankungen mit onkoneuralen Antikörpern durch das Absterben von Neuronen weniger erfolgreich ist. (Lancaster, 2016; Lancaster and Dalmau, 2012)

### **1.1.4.1.1.1 Anti-GABA<sub>A</sub>-Enzephalitis**

Eine Unterform der Autoimmunenzephalitis ist die Anti-GABA<sub>A</sub>-Enzephalitis, die somit zur Gruppe der Enzephalitiden mit Ak gegen Zelloberflächenstrukturen gehört. (Lancaster, 2016)

Die Zielstruktur, der GABA<sub>A</sub>-Rezeptor (siehe Abbildung 4), ist ein aus fünf Untereinheiten (aus dem Repertoire von  $\alpha$ -,  $\beta$ -, und  $\gamma$ -Untereinheiten) gebildeter, Liganden gesteuerter Ionenkanal. (Lorenz-Guertin and Jacob, 2017) Dieser v. a. für die schnelle Inhibition im ZNS verantwortliche Rezeptor ist Bindungspunkt einer Reihe von Pharmaka und Drogen wie Anxiolytika und Anti-Epileptika wie Benzodiazepine und Barbiturate, sowie für Alkohol und Neurosteroiden. (Lorenz-Guertin and Jacob, 2017; Ohkawa et al., 2014) Durch Bindung von GABA oder seinen Agonisten am Rezeptor kommt zu einer Öffnung des Ionenkanals, durch den in der Folge negativ geladene Chlorid-Ionen einströmen und zu einer Hyperpolarisation führen. (Lorenz-Guertin and Jacob, 2017)

Mit einer gestörten GABAergen Neurotransmission werden eine Reihe neurologischer und psychiatrischer Erkrankungen wie Epilepsie, Angststörungen, PTBS und Schizophrenie assoziiert. (Cossette et al., 2002; Gonzalez-Burgos et al., 2011; Lorenz-Guertin and Jacob, 2017; Moller et al., 2016; Nuss, 2015)



**Abbildung 4: GABA<sub>A</sub>-R-Struktur und Aufbau aus Untereinheiten.** (A) Aufbau des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors aus 5 Untereinheiten. Die Bindung von GABA (gelber Kreis) führt zur Öffnung und zu Chlorid-Einstrom durch den Ionenkanal mit nachfolgender Hyperpolarisation. (B) Untereinheiten und Bindungsstellen von Benzodiazepinen (rotes Kästchen) und GABA (gelber Kreis). (C) Aufbau der einzelnen Subeinheiten aus 4 Transmembrandomänen (TM1-TM4) und N- und C-Terminus. (Lorenz-Guertin and Jacob, 2017) Modifiziert nach Lorenz-Guertin and Jacob, 2017.

GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Enzephalitiden äußern sich durch Verhaltens- und Bewusstseinsänderung, kognitive Einschränkungen, Bewegungsstörungen, unter Umständen Epilepsia partialis continua oder Krampfanfälle bis hin zum Status Epilepticus. (Petit-Pedrol et al., 2014; Spatola et al., 2017) Bei untersuchten Patienten wurden Antikörper gegen die α<sub>1</sub>- und β<sub>3</sub>-Untereinheit des Rezeptors (Petit-Pedrol et al., 2014) und in der Folge auch gegen die γ<sub>2</sub>-Untereinheit gefunden. (Ohkawa et al., 2014; Spatola et al., 2017)

Die Antikörper führen zu einem Verlust von GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren an den Synapsen, nicht jedoch entlang der Dendriten (Petit-Pedrol et al., 2014), da vor allem an den Synapsen eine betroffene Untereinheiten, die α<sub>1</sub>-Untereinheit, gehäuft vorkommt. (Petit-Pedrol et al., 2014) Durch kompensatorisch vermehrte extrasynaptische Rezeptorexpression nimmt die Gesamtmenge an GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren jedoch nicht ab. (Petit-Pedrol et al., 2014)

Unter den Patienten waren sowohl Erwachsene als auch Kinder. (Petit-Pedrol et al., 2014) Es zeigten sich im MRT meist multifokale kortikale und subkortikale Veränderungen (Spatola et al., 2017), sowie zusätzliche Autoantikörper (Thyreoid Peroxidase (TPO), Thyreoglobulin-Ak, GAD65- und GABA<sub>B</sub>-Rezeptor-Ak) bei einer Reihe der Patienten. Zusammen mit der Anamnese einiger Probanden (u. a. idiopathische thrombozytopenische Purpura in der Vorgeschichte) lässt dies einen Hang zur Autoimmunität bzw. Immundysregulation in diesem Kollektiv vermuten. (Petit-Pedrol et al., 2014)

Die Behandlung erfolgte mit Immuntherapie, Antiepileptika oder auch mit pharmakologisch induziertem Koma, und führte teils zu völliger, teils zu partieller Heilung. Auch Jahre danach werden unter Umständen noch antiepileptische Medikamente benötigt. Es gab zudem auch Todesfälle. (Petit-Pedrol et al., 2014; Spatola et al., 2017)

Obwohl es zunächst schien als ob GABA<sub>A</sub>-Ak nicht gehäuft mit Tumorerkrankungen assoziiert wären (Petit-Pedrol et al., 2014), haben neuere Ergebnisse gezeigt, dass bei 40 Prozent der Patienten in einer Studie zu GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Enzephalitiden Tumore festgestellt werden konnten. Dabei handelte es sich v. a. um Thymome. (Spatola et al., 2017) Bei Kindern mit dieser Erkrankung wurden seltener

Tumore festgestellt als bei erwachsenen Betroffenen. Somit ist aber zumindest bei einem Teil der Patienten die Behandlung des zugrundeliegenden Tumors (Spatola et al., 2017), wie bereits zuvor allgemein für Autoimmunenkephaliden aufgeführt, ein zusätzlicher Ansatz.

### 1.1.4.1.1.1 Indexpatient 2

Ein männlicher Patient, auch Indexpatient 2 genannt, aus einer Gruppe mit hohen Antikörperkonzentrationen im Serum und Antikörpern in der CSF von Petit-Pedrol (Petit-Pedrol et al., 2014) soll noch gesondert besprochen werden. Er fiel beispielsweise mit Veränderungen des Verhaltens, Depression und Psychose auf. Im Verlauf entwickelte er partielle klonische Anfälle und Epilepsia partialis bis hin zum Status Epilepticus. Im weiteren Verlauf starb der Patient nach 10 Wochen im persistierenden Status Epilepticus an einer Sepsis. (Petit-Pedrol et al., 2014) In seinem Serum fanden sich Antikörper gegen die  $\alpha_1$ - und  $\beta_3$ -Untereinheit des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors, in der CSF selbst wurden Antikörper gegen die  $\alpha_1$ -Untereinheit des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors gefunden. Indexpatient 2 war 51 Jahre alt und litt an einer idiopathischen thrombozytopenischen Purpura. Zusätzlich wurden TPO und Thyreoglobulin-Antikörper gefunden. (Petit-Pedrol et al., 2014)

Weitere Informationen zu IP2 sammelte S. Brändle im Rahmen ihrer Arbeit in der Arbeitsgruppe Dornmair. S. Brändle untersuchte im Rahmen ihrer Dissertation einen von E. Beltran in der CSF identifizierten monoklonal expandierten Ak dieses Patienten. (E. Beltran, unpubliziert) Sie suchte nach Reaktivität dieses Antikörpers mit systemischen Proteinen, auf deren Basis hypothetisch über Kreuzreaktivität schließlich der GABA<sub>A</sub>-Rezeptor paraneoplastisch angegriffen werden könnte. (Brändle, 2016)

Der rekombinante Ak erkannte schließlich neben der extrazellulären  $\alpha_1$ -Untereinheit des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors auch das Protein CSRP2. (Brändle, 2016) CSRP2 (*Cysteine and glycine-rich protein 2*) ist ein LIM-Domänen Protein, dessen Rolle in regulatorischen Prozessen von Zellwachstum und -differenzierung, Zellproliferation und -transformation bis hin zur Tumorentstehung diskutiert wird. (Hoffmann et al., 2016; Jain et al., 1998; Louis et al., 1997; Midorikawa et al., 2002; Wang et al., 2017; Weiskirchen and Gunther, 2003; Weiskirchen et al., 2001; Weiskirchen et al., 1995) Auch die verwandten *LIM-Domain-only* Proteine sind wohl mit Entartungen assoziiert. (Matthews et al., 2013) Sowohl der GABA<sub>A</sub>-Rezeptor (Hosie et al., 2003) als auch LIM Proteine sind Zink bindend (Kosa et al., 1994; Schmeichel and Beckerle, 1997), wobei die Bedeutung dieser Gemeinsamkeit derzeit noch zu klären ist. (Brändle, 2016)

### 1.1.4.1.2 Multiple Sklerose

Die ZNS-Erkrankung Multiple Sklerose (MS) wird allgemein als Autoimmunerkrankung angesehen und betrifft weltweit etwa 2,5 Millionen Menschen. (Dendrou et al., 2015; Hohlfeld et al., 2015) Die Krankheit beginnt meist um das 30. Lebensjahr. Frauen erkranken häufiger als Männer. (Dendrou et al., 2015; Simpson et al., 2015) Die MS zeichnet sich unter anderem durch die Bildung von demyelinisierten sklerotischen Plaques aus. Je nach Lokalisation führen diese zu entsprechenden neurologischen Ausfällen wie Sehstörungen oder Störungen der Sensibilität. Zudem ist die MS gekennzeichnet durch entzündliche Infiltrate, axonale und neuronale Verletzungen, Astrozytose und zum Teil Remyelinisierung. (Compston and Coles, 2008; O'Connor et al., 2001)

Die Auslöser der Erkrankung sind weiterhin unbekannt, es konnten aber genetische Risikofaktoren aufgezeigt werden. (Beecham et al., 2013; Compston and Coles, 2008) Umwelt- (Ascherio and

Munger, 2007b) und Infektionsfaktoren wie der EBV-Virus (Ascherio and Munger, 2007a) werden als Mitverursacher diskutiert.

Die Erkrankung beginnt oft mit einem klinisch isolierten Syndrom (KIS). (Compston and Coles, 2008) Später kann sie anhand des Verlaufs in RR (*Relapse Remitting*) und PP (*Primärprogredient*) eingeteilt werden. Die RR-MS kann im Verlauf in eine sekundärprogrediente Form übergehen. (O'Connor et al., 2001) Es ist möglich, dass sich die Pathophysiologie der progressiven von der der schubweise verlaufenden Formen unterscheidet. (Dendrou et al., 2015)

Die Diagnose wird anhand der modifizierten McDonald Kriterien gestellt, die v. a. eine räumliche und zeitliche Dissemination von Läsionen voraussetzt. (Polman et al., 2011) Prädispositionsstellen für die MS sind hiernach juxtakortikal, periventrikulär, infratentoriell sowie spinal. (Polman et al., 2011)

In den entzündlichen Infiltraten lassen sich Makrophagen, CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, CD4<sup>+</sup>-T-Zellen und Mikroglia,  $\gamma/\delta$ -T-Zellen und Plasmazellen ausmachen. (Lucchinetti et al., 2000; O'Connor et al., 2001)

Die Immunopathologie der Läsionen kann jedoch bei verschiedenen Patienten sehr unterschiedlich sein und ist wohl auch vom Stadium der Erkrankung abhängig. (Lucchinetti et al., 2000). Auch NK-Zellen konnten in aktiven MS-Läsionen nachgewiesen werden. (Gross et al., 2016)

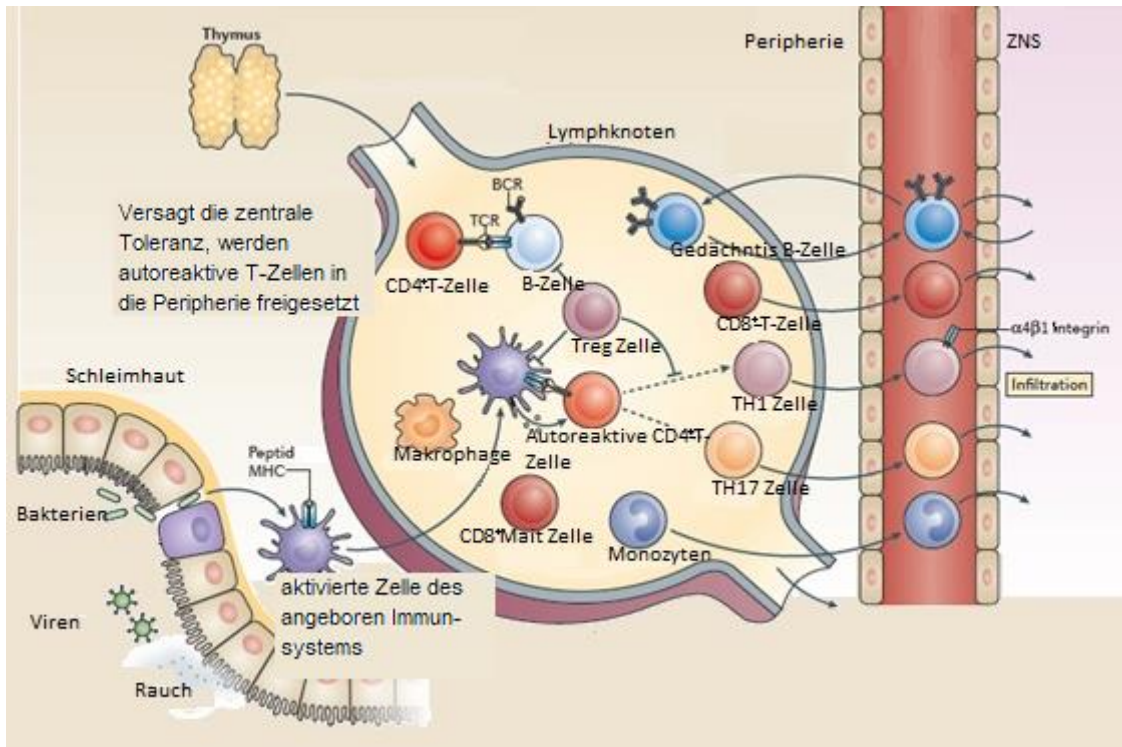
B-Zellen spielen eine Rolle als intrathekale Produzenten der sogenannten oligoklonalen Banden (Hestvik, 2010; O'Connor et al., 2001), die bei über 90 % der MS-Patienten in der CSF nachweisbar sind und daher auch als diagnostisches Kriterium dienen. (Compston and Coles, 2008; Dendrou et al., 2015; Hestvik, 2010; Meinl et al., 2006; Thompson et al., 1979) Teils sind sie nur Ergebnis einer sekundären Immunreaktion und gegen ubiquitäre intrazelluläre Antigene gerichtet (Brandle et al., 2016), teils jedoch auch gegen diverse mikrobielle bzw. virale Antigene. (O'Connor et al., 2001) Dass B-Zellen eine nicht unbedeutende Stellung in der Erkrankung haben, zeigen die therapeutischen Effekte des CD20-Antikörpers Rituximab bei MS, der gegen CD20 exprimierende B-Zellen wirkt. Ob Anteile der OKB dennoch direkt an der Pathogenese beteiligt sind, bleibt unklar. (Hestvik, 2010)

Das Tiermodell der MS, die sogenannte EAE (*Experimental autoimmune encephalomyelitis*) in Mäusen, wird durch autoreaktive CD4<sup>+</sup>-Th1-Zellen und v. a. Th17-Zellen verursacht, die spezifisch für ZNS-Antigene aus dem Myelinspektrum wie MOG, MBP und PLP sind. (Dendrou et al., 2015; Langrish et al., 2005; Miller et al., 2007)

Bei der humanen MS ist die vorherrschende Theorie, dass die Erkrankung ebenfalls durch autoreaktive Lymphozyten ausgelöst wird. (Dendrou et al., 2015) Diese gelangen über die Blut-Hirn-Schranke und sind gegen ZNS-Autoantigene gerichtet. (Compston and Coles, 2008; Dendrou et al., 2015) Sie wirken im Zusammenspiel mit einem Defekt von regulatorischen Zellen und anderen regulatorischen Mechanismen. (Baughman et al., 2011; Compston and Coles, 2008; Dendrou et al., 2015) Die auslösenden Antigene sind jedoch bis heute Gegenstand der Forschung. Im Menschen überwiegen zudem anders als bei den Tiermodellen Makrophagen und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen gegenüber von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen in den Läsionen. (Babbe et al., 2000; Compston and Coles, 2008; Dendrou et al., 2015; Hohlfeld et al., 2016)

In Abbildung 5 sind noch einmal die an der Entstehung der MS beteiligten Elemente dargestellt.





**Abbildung 5: Darstellung der Immunpathogenese und der beteiligten Zellen bei MS.** Scheitern zentrale und periphere Toleranzinduktion, dann können B- und T-Zellen, die gegen ZNS Bestandteile gerichtet sind, über verschiedene Wege in der Peripherie aktiviert werden (z. B. durch molekulares Mimikry). Exogene Faktoren wie Infektionen (Viren, Bakterien) und Rauchbestandteile sowie genetische Faktoren tragen hierzu bei. Die aktivierten Immunzellen wandern ins ZNS ein und lösen die Erkrankung aus. (Dendrou et al., 2015) Modifiziert nach Dendrou et al., 2015.

#### 1.1.4.1.2.1 Rolle von speziellen T-Zell-Subpopulationen und NK-Zellen bei MS

Mittlerweile ist bekannt, dass CD8<sup>+</sup>-T-Zellen in MS-Läsionen die überwiegende Zellpopulation darstellen (Babbe et al., 2000; Hohlfeld et al., 2016), und dass manche Klone über Jahre hinweg in der CSF und auch im Blut der Patienten nachweisbar bleiben. (Skulina et al., 2004) Dennoch ist noch nicht vollständig geklärt, welche Rolle die expandierten T-Zell-Klone für die Entstehung und den Verlauf der Erkrankung spielen. Die klonale Expansion deutet darauf hin, dass sie spezifische Antigene erkennen. (Babbe et al., 2000; Dornmair et al., 2009; Siewert et al., 2012) Ob sie aber direkt pathogene zytotoxische Effektorzellen sind, oder aber auch eine regulatorische Funktion innehaben können, und welche Antigene sie erkennen, sind weiterhin Gegenstände aktueller Forschung. (Babbe et al., 2000; Hohlfeld et al., 2016)

Es gibt sowohl Studien zu zytotoxischen Effekten von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen gegenüber ZNS-Bestandteilen wie Oligodendrozyten (Jurewicz et al., 1998), als auch neuere Studien, die gehäuft eine regulatorische Rolle der CD8<sup>+</sup>-T-Zellen bei der Erkrankung MS berichten, durch deren Versagen es zu Exazerbationen kommen kann. (Baughman et al., 2011; Correale and Villa, 2008)

Auch weitere T-Zell-Populationen wie die MAIT (*Mucosal associated invariant T*)-Zellen, die bakterielle Vitamin B Metabolite über das nicht klassische MHC-I-Molekül MR1 erkennen (Held et al., 2015), und γ/δ-TZR-T-Zellen sind wohl relevant in der MS. Letztere können ebenfalls Oligodendrozyten lysieren. (Freedman et al., 1991; Wucherpfennig et al., 1992)

Darüber hinaus spielen NK-Zellen eine Rolle in der Erkrankung. (Gross et al., 2016) NK-Zellen des angeborenen Immunsystems sind hauptsächlich für ihre Funktion bei der Bekämpfung von Tumoren und Virusinfektionen bekannt (Borrego et al., 2002), sind des Weiteren aber an der Regulation von



Autoimmunität bei MS beteiligt. (Gross et al., 2016) In einer Studie konnte durch die Modulation des IL-2 Rezeptors mittels des MS-Therapeutikums Daclizumab die zytolytische Aktivität der NK-Zellen verbessert und ihre bei MS verminderte Einflussnahme auf aktivierte CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wieder gesteigert werden. (Gross et al., 2016) Daclizumab wurde jedoch schließlich im März 2018 vom Markt genommen, da es unter der Behandlung zu schwerwiegenden Nebenwirkung kam. (Rauer et al., 2018) Die Rolle von NK-Zellen in Autoimmunität wird weiterhin erforscht. (Schleinitz et al., 2010)

Ob NK-Zellen zytolytisch auf Zielzellen einwirken, wird durch die Interaktion von aktivierenden oder hemmenden Rezeptoren auf den NK-Zellen mit deren Bindungspartnern auf den Zielzellen bestimmt. (Gross et al., 2016; Lanier, 2008) Zu diesen Rezeptoren gehört auch die NKG2-Familie. Diese zählt zur Gruppe der C-Typ Lektin-ähnlichen Rezeptoren und besteht derzeit aus NKG2A, NKG2B, NKG2C, NKG2D, NKG2E, NKG2H und NKG2F. (Borrego et al., 2006) Zum Teil werden diese Rezeptoren auch auf Untergruppen von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen und  $\gamma/\delta$ -T-Zellen exprimiert. (Bauer et al., 1999; Borrego et al., 2002; Borrego et al., 2006; Carena et al., 1997)

Die einzelnen Mitglieder können entsprechend ihrer vermittelten hemmenden oder aktivierenden Wirkung in zwei Gruppen eingeteilt werden, wobei NKG2D und NKG2F eine Sonderrolle zukommt. (Borrego et al., 2006) Eine Übersicht über die NKG2-Familie sowie die einzelnen Funktionen der Unterformen gibt Tabelle 1.

**Tabelle 1: Übersicht über die verschiedenen NKG2-Subtypen, ihre Funktion und Besonderheiten**

Subtyp	Funktion	Besonderheiten
NKG2A	Inhibition	
NKG2B	Inhibition	Splicevariante von NKG2A
NKG2C	Aktivierung	
NKG2D	Aktivierung	Interaktion mit DAP10, Homodimer
NKG2E	Aktivierung	
NKG2F	Aktivierung	Paarung mit DAP12
NKG2H	Aktivierung	Splicevariante von NKG2E

Zu den inhibitorischen Rezeptoren gehört NKG2A (Houchins et al., 1997; O'Connor et al., 2006) sowie die Splicevariante NKG2B. (Wada et al., 2004) Über ITIMs (*immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs*) wird eine inhibitorische Kaskade in Gang gesetzt (Houchins et al., 1997; Wada et al., 2004), was zu einer verminderten Zelllyse durch NK-Zellen bzw. T-Zellen führen kann, bzw. zu einer heraufgesetzten Aktivierungsschwelle. (Borrego et al., 1998; Noppen et al., 1998)

NKG2C (Houchins et al., 1997; O'Connor et al., 2006), NKG2E (Biassoni et al., 2000) und NKG2H, das eine Splicevariante von NKG2E ist (Bellón et al., 1999), sowie NKG2F und NKG2D (siehe unten) (Bauer et al., 1999; Kim et al., 2004), wirken aktivierend auf die Zellen.

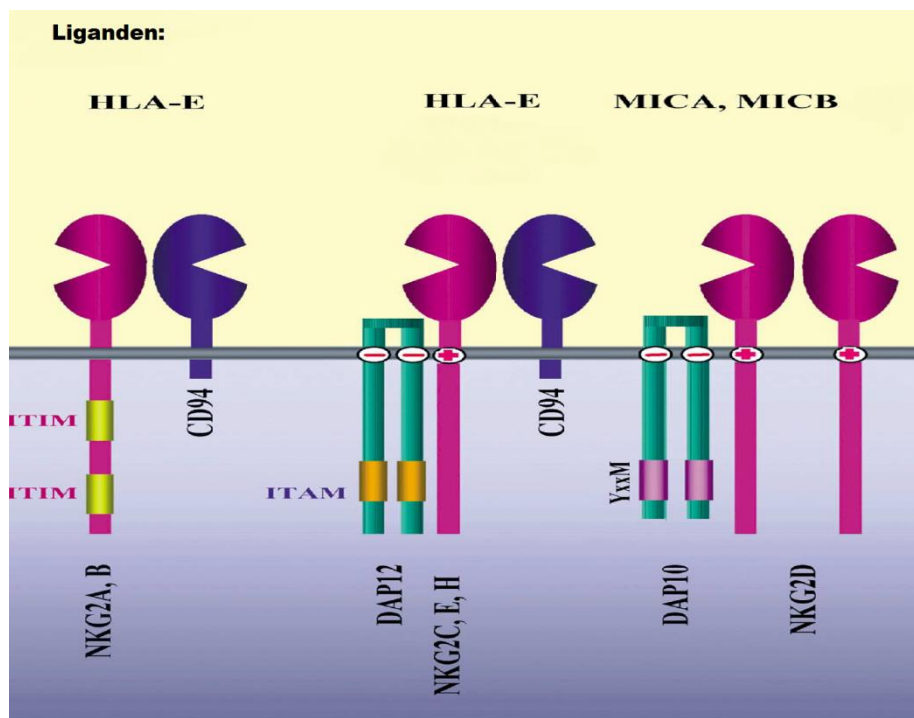
Die meisten NKG2-Produkte können Heterodimere mit CD94 bilden. (Borrego et al., 2006; Lazetic et al., 1996) Sie erkennen Peptide, die ihnen auf HLA-E (Borrego et al., 1998; Braud et al., 1998), einem nicht klassischen MHC-Typ-Ib-Molekül (O'Callaghan and Bell, 1998; Shawar et al., 1994), präsentiert werden. HLA-E kommt in unterschiedlichen Geweben beim Menschen vor (u. a. in T-Lymphozyten) und wird von einem konservierten, nicht polymorphen Genlocus kodiert. (O'Callaghan, 2000; Wei and Orr, 1990)

Während die Übereinstimmung in den extrazellulären Domänen zwischen NKG2A, NKG2C und NKG2E bei 95 % liegt, beträgt sie im Vergleich mit NKG2D nur 25 %. (Houchins et al., 1997)

NKG2D ebenso wie NKG2F, denen gleichermaßen eine aktivierende Wirkung zugeschrieben wird (Bauer et al., 1999; Kim et al., 2004), nehmen eine Sonderstellung ein. NKG2D interagiert als Homodimer mit DAP10 (Borrego et al., 2006; Raulet, 2003; Wu et al., 1999) und NKG2F kann sich nur mit DAP12, aber nicht mit CD94, paaren. (Kim et al., 2004)

Auch die Antigenerkennung bei diesen Rezeptoren verläuft anders. Bei NKG2D über das als zellulären Stressmarker angesehene MICA (*MHC class-I-chain-related protein A*), ein nicht klassisches Klasse-I-MHC-Molekül, und über MICB sowie ähnliche Moleküle. (Bauer et al., 1999; Raulet, 2003) Die Liganden von NKG2F sind noch unbekannt. (Huang et al., 2010)

Eine erneute Übersicht über die Mitglieder der NKG2-Familie und ihre Bindungspartner gibt Abbildung 6.



**Abbildung 6: Vereinfachte schematische Darstellung verschiedener NKG2-Moleküle und ihrer Liganden.** Die Mehrzahl der NKG2-Moleküle bildet Heterodimere mit CD94, wie auch hier für NKG2A/B und NKG2C/E/H dargestellt. Bei NKG2A/B wird über ITIMs eine inhibitorische Kaskade in Gang gesetzt. NKG2C und wohl NKG2E und NKG2H sollen über das Adaptermolekül DAP12 und darin enthaltene ITAMs (*immunoreceptor tyrosine-based activating motifs*) aktivierend wirken. (Brostjan et al., 2002; Gunturi et al., 2004; Lanier et al., 1998; Pegram et al., 2011) Als Ligand der meisten NKG2-Formen wurde HLA-E eruiert. (Braud et al., 1998; Pegram et al., 2011) NKG2D nimmt wie erwähnt eine Sonderstellung ein. Es bildet Homodimere und interagiert mit DAP10. Bindungspartner hier sind MICA und MICB und ähnliche Moleküle. NKG2F ist nicht dargestellt. Modifiziert nach Borrego et al., 2002.

#### 1.1.4.1.2.2 Patient A

Ein ausführlich untersuchter MS-Patient soll an dieser Stelle vorgestellt werden. Der sogenannte Patient A erhielt nach mehreren Episoden von Hemianopsie 1996 zunächst die MRT-gestützte Diagnose eines temporookzipital gelegenen Glioms, das daraufhin chirurgisch entfernt wurde. In der histologischen Aufarbeitung zeigte sich allerdings eine MS-Läsion. Ein Teil des entfernten Hirnmaterials wurde in Flüssigstickstoff gelagert. Es stehen zudem Blutproben und Cerebrospinalflüssigkeit des Patienten für Forschungszwecke zur Verfügung. (Skulina et al., 2004)

Das Hirngewebe wurde in der Folge in Blöcke aufgeteilt und mit Nummern versehen. Die beiden für diese Dissertation relevanten Blöcke (Blöcke 10 und 12) gehören zu den sechs großen Blöcken dieser 14

Probe. Sie wurden noch mal halbiert und somit in 10A und b und 12 A und b aufgeteilt. Aus diesen standen 10 µm dicke Hirnschnitte zur Verfügung. Region und Block wird in Bezug auf Patient A in dieser Arbeit synonym verwendet.

Insgesamt war das Gehirn von Patient A bei Probenentnahme bereits stark entzündlich durchsetzt und sowohl Region 10A als auch Region 12b, aus denen Hirnschnitte in dieser Arbeit verwendet wurden, zeichneten sich durch stark aktive Läsionen aus. (Backes, 2010)

Auffällig bei diesem Patienten ist, dass er homozygot für alle HLA-Allele ist, nämlich: HLA-A\*01:01, HLA-B\*08:01, HLA-C\*07:01, HLA-DRB1\*03:01, HLA-DRB3\*01:01, HLA-DQA1\*05, HLA-DQB1\*02:01. (Skulina et al., 2004) In weiterführenden Analysen wurden in der Hirnbiopsie mehrere expandierte CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Klone gefunden, die z. T. auch im Blut und/oder in der CSF nachweisbaren waren, und dies teilweise über mehrere Jahre blieben. (Skulina et al., 2004)

Dass die Gebiete 10A und 12b von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen infiltriert sind, war von A. Backes bereits bestätigt worden. (Backes, 2010) Untersuchungen von K. Held bestätigten das Vorkommen von vielen CD8<sup>+</sup> Zellen in Region 12b und Region 10A. Vor allem zeigten sich jedoch auch CD94<sup>+</sup>-NKG2A<sup>+</sup> Zellen. (persönliche Kommunikation mit K. Held) Zum Teil 40-48 % der angefärbten CD8<sup>+</sup> Zellen in den MS-Läsionen waren doppelpositiv für CD8α und CD94. (persönliche Kommunikation mit M. Konjevic und unveröffentlichte Daten K. Held)

Um diese Zellpopulation von NK-Zellen abzugrenzen (die teils auch CD8 exprimieren können (Arlettaz et al., 2004; Moebius et al., 1991)), wurde von M. Konjevic zusätzlich eine dreifache Färbung mit CD3, CD8α und CD94 in der Region 10A durchgeführt. Hierbei zeigten sich etwa 30-40 % der CD8α<sup>+</sup>-CD3<sup>+</sup> Zellen CD8α<sup>+</sup>-CD3<sup>+</sup>-CD94<sup>+</sup>. Es handelt sich bei diesen CD94<sup>+</sup> Zellen also um T-Zellen. Der Anteil von NK-Zellen (CD3<sup>-</sup>-CD8<sup>+/-</sup>-CD94<sup>+</sup>) lag bei etwa 5 %.

Zudem wurde CD94 in den MS-Läsionen zumeist mit NKG2A co-exprimiert. (unveröffentlichte Daten K. Held) Verglichen damit fand K. Held, dass der Anteil CD94<sup>+</sup>-CD8α<sup>+</sup> Zellen in Tonsillengewebe und Blut von je einem gesunden Patienten nur bei 6 bzw. 4 % lag. (unveröffentlichte Daten K. Held)

Wie bereits erwähnt, ist bekannt, dass derartige NK-Rezeptoren u. a. auf Unterpopulationen von T-Zellen exprimiert werden. (Bauer et al., 1999; Borrego et al., 2002; Carena et al., 1997; Takei et al., 2001) Für CD94/NKG2A wurde eine Hochregulierung nach Antigenkontakt beschrieben (Braud et al., 2003), die zum einen der Apoptose der T-Zelle entgegenwirkt, sowie die Bildung von Gedächtnis-T-Zellen fördert und die Immunreaktion abschwächen kann. (Braud et al., 2003; Gunturi et al., 2003, 2004)

## 1.2 Antigensuche

### 1.2.1 Techniken zur Identifizierung von T-Zell-Antigenen

Antigene von T-Zellen zu finden, ist aus vielerlei Gründen schwierig (Sharma and Holt, 2014), weswegen es bis vor einiger Zeit keine unvoreingenommene Methode hierfür gab. (Siewert et al., 2012) Zum einen haben TZR im Vergleich zu Antikörpern eine wesentlich niedrigere Affinität zu ihrem passenden MHC-Peptid-Komplex. (Matsui et al., 1991; Siewert et al., 2012) Zum anderen

erkennen TZR nicht nur ein Antigen. Vielmehr sind sie polyspezifisch (Wooldridge et al., 2012) und binden auch dem eigentlichen Antigen ähnliche Peptide (sogenannte Mimotope). (Siewert et al., 2012) Darüber hinaus reagieren sie mit dem Antigen nicht in der nativen Form wie Immunglobuline bzw. B-Zellen, sondern erst nach dessen Prozessierung in APZ und unter Vermittlung verschiedenster MHC-Moleküle. (Blum et al., 2013; Vyas et al., 2008) In vitro hierbei die gleichen Bedingungen zu schaffen wie in vivo ist mitunter schwierig. Autologe APZ sind oft nicht verfügbar und die verfügbaren Modell-APZ nehmen unter Umständen eine andere Prozessierung vor, in der das Antigen nicht mehr erkannt wird, zumal diese Prozessierung Zelltyp-abhängig sein könnte. (Arakawa et al., 2015; Kniepert and Groettrup, 2014; Siewert et al., 2012)

Dennoch sind in den letzten Jahren einige Techniken zur Identifizierung von T-Zell-Antigenen entwickelt worden (Sharma and Holt, 2014), was das gesteigerte Interesse an T-Zellen mit ihrer zentralen Rolle in Autoimmunerkrankungen widerspiegelt.

Zunächst ist es wichtig, krankheitsrelevante CD8<sup>+</sup>-T-Zellen von unwichtigen Zuschauern zu unterscheiden. Hierfür werden verschiedene Kriterien angewandt. Die unmittelbare Nähe von entsprechenden T-Zellen zu Zielstrukturen sowie die Expression von Aktivierungsmarkern sowie von Perforinen, Granzymen oder ähnlichem liefern erste Hinweise auf eine Beteiligung an der Erkrankung und können für weitergehende Analysen herangezogen werden. (Konjevic Sabolek et al., 2019) Des Weiteren lässt sich mit einer Analyse des TZR-Repertoires entsprechender Zellen feststellen, ob diese klonal expandiert sind, was ebenfalls darauf hindeutet, dass sie durch das Erkennen eines Antigens zur Proliferation angeregt wurden. (Dornmair et al., 2003; Dornmair et al., 2009; Siewert et al., 2012)

Wurden anhand dieser Kriterien relevante T-Zellen ausgemacht, gilt es zu ergründen, gegen welches Antigen sie gerichtet sind.

Eine Auswahl der Techniken zur Antigenidentifizierung von krankheitsrelevanten T-Zellen wird im Folgenden kurz vorgestellt. Die Technik der unvoreingenommenen Antigen-Identifizierung, die in der Arbeitsgruppe Dornmair entwickelt und validiert wurde (Arakawa et al., 2015; Ruhl et al., 2016; Siewert et al., 2012), wird unter 1.2.2 ausgeführt.

Erste Versuche zur Antigenidentifizierung wurden mit mit DNA Bibliotheken transfizierten Melanomzellen unternommen. (van der Bruggen et al., 1991) Die Verwendung synthetischer Peptid-Bibliotheken war ein weiterer Fortschritt. (Gundlach et al., 1996) Es blieb jedoch das Problem, das aktivierende Peptid aus der Masse nicht aktivierender Peptide herausfiltern zu können. Erst durch die Konstruktion eines Plasmides mit einer Bibliothek, die für Peptide kodiert, wurde die Möglichkeit eröffnet, das aktivierende Plasmid zu vervielfältigen. (Siewert et al., 2012)

Eine weitere Herausforderung ist die Frage, wie die Aktivierung der T-Zellen durch ein Antigen am besten gemessen werden kann.

Eine Möglichkeit ist die Messung von Interferon  $\gamma$  mittels Elispot. Interferon  $\gamma$  wird von aktivierten T-Zellen sekretiert, nachdem sie auf APZ gestoßen sind, die ein passendes Antigen nach Transfektion präsentieren. (Czerkinsky et al., 1983; Sharma and Holt, 2014)

Ein Großteil der aufgeführten Probleme (Antigenprozessierung, niedrige Affinität des TZR etc.) wurde mit der unter 1.2.2 ausgeführten Technik zur unvoreingenommenen Antigenidentifizierung von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen mit Plasmid-kodierten kombinatorischen Peptidbibliotheken gelöst.

### 1.2.2 Technik der unvoreingenommenen Antigen-Identifizierung mit Plasmid-kodierten kombinatorischen Peptidbibliotheken (PECPL)

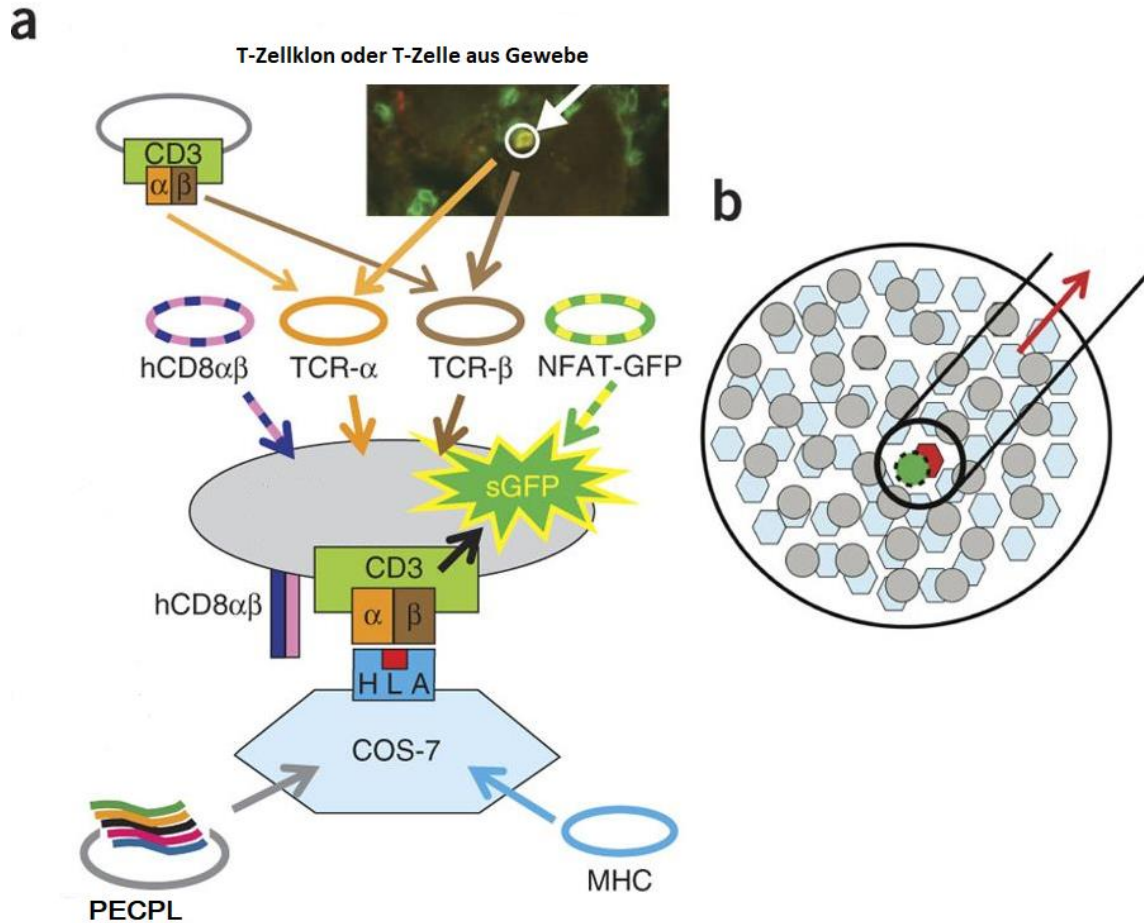
Zur Identifizierung von T-Zell-Antigenen wurde in dieser Arbeit u. a. die unvoreingenommene Technik mittels Plasmid-kodierter kombinatorischer Peptidbibliotheken (*Plasmid-encoded combinatorial Peptide Library – PECPL*), wie von Siewert et al. beschrieben, verwendet. (Siewert et al., 2012)

Dabei werden in eine  $58\alpha/\beta$ -T-Hybridomzelle die  $\alpha$ - und  $\beta$ - Kette des zu untersuchenden T-Zell-Rezeptors kloniert, zusammen mit den humanen CD8 $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten und sGFP (*super green fluorescent protein*) unter der Kontrolle des NFAT (*Nuclear Factor of activated T-cells*) Enhancers. Somit sind auf der Oberfläche der Hybridomzellen der TZR mit CD3-Molekül und CD8 präsentiert. Die Zellen werden mit COS-7 Zellen als antigenpräsentierende Zellen in Kokultur gesetzt, in die zuvor MHC-Klasse-I-Moleküle und *PECPL* definierter Länge transfiziert wurden. Über die MHC-Moleküle werden dann Peptide auf der Oberfläche präsentiert.

Wird der Peptid-MHC-Komplex vom TZR der Hybridomzellen erkannt, werden diese aktiviert und produzieren sGFP. sGFP und GFP werden in Bezug auf Hybridomzellen in dieser Arbeit synonym verwendet. Die Aktivierung geschieht dabei über den TZR-Komplex bestehend aus dem TZR und assoziierten Molekülen wie den CD3-Molekülen. Über diese Moleküle wird bei Antigenbindung über die Phosphorylierung von ITAMs (*immunoreceptor tyrosine-based activating motifs*) des TZR-Komplexes die Tyrosin-Kinase ZAP70 akquiriert, die weitere Schritte initiiert. Schließlich wird unter anderem durch eine erhöhte zytosolische Calciumkonzentration über Calmodulin und Calcineurin die Dephosphorylierung von NFAT und dessen Eintritt in den Zellkern bewirkt. (Weaver, 2017) NFAT ist der Transkriptionsfaktor, der zur Expression von IL-2 und anderen Genen der T-Zellaktivierung führt. (Weaver, 2017) Da in den Hybridomen auch sGFP unter der Kontrolle von NFAT vorliegt, wird dieses bei Aktivierung ebenfalls produziert, und führt zu einem grünen Leuchten der Zellen. Dieses Leuchten kann unter einem Fluoreszenzmikroskop wahrgenommen werden. Die darunter liegende antigenpräsentierende Zelle kann dann mittels einer Kapillare isoliert werden. Das antigenkodierende Plasmid aus dieser Zelle wird subkloniert und sequenziert. (Siewert et al., 2012) Der Ablauf des Experiments ist in Abbildung 7 schematisch dargestellt.

Da TZR zumeist mehrere Peptide erkennen können, die sich in einigen Aminosäuren unterscheiden, kann ein sogenanntes Mimotop des eigentlichen Antigens gefunden werden. Auf Grundlage mehrerer Mimotope wird das ursprüngliche Antigen ermittelt. (Siewert et al., 2012)

Mithilfe dieser Methode entfällt die Abhängigkeit davon, dass die Antigenprozessierung in den APZ richtig ablaufen muss, wie das beim Screening von cDNA Bibliotheken noch der Fall ist. (Siewert et al., 2012) Zudem können schon einzelne aktivierte Zellen entdeckt werden und das aktivierende Korrelat gezielt isoliert und vervielfältigt werden. Die niedrige Affinität der TZR zu den MHC-Peptid-Komplexen wird dadurch kompensiert, dass die T-Zellen durch die Schwerkraft ihren Kontakt zur APZ behalten. (Siewert et al., 2012)



**Abbildung 7: Schematische Darstellung des (a) Ablaufs des Experiments sowie der (b) Isolierung von Zellen mittels einer Kapillare.** (a) In eine  $58\alpha/\beta$ -T-Hybridomzelle (grau gefülltes Oval) werden die  $\alpha$ - und  $\beta$ - Kette des zu untersuchenden T-Zell-Rezeptors, die humane CD8 $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette und NFAT-sGFP transfiziert. Die Zellen werden mit COS-7 Zellen in Kokultur gesetzt, in die MHC-Klasse-I-Moleküle und eine *Plasmid-encoded combinatorial peptide library* (PECPL) definierter Länge transfiziert wurden. Über die MHC-Moleküle werden dann Peptide auf der Oberfläche der COS-7 Zellen präsentiert. Wird eines dieser Peptide von T-Hybridomzellen erkannt, produzieren diese sGFP. (b) APZ (rot) unter aktivierten, sGFP-exprimierenden T-Hybridomen (grün) werden mittels einer Glaskapillare isoliert. (Siewert et al., 2012) Modifiziert nach Siewert et al., 2012.

### 1.3 Zielsetzung

Die Zielsetzung dieser Dissertation war, einen Beitrag zur Charakterisierung von T-Zellen und ihren Rezeptoren bei neurologischen entzündlichen Erkrankungen zu leisten. Insbesondere die Aufdeckung von Zielstrukturen pathogener T-Zellen und die Charakterisierung von beteiligten Zellsubtypen würde das Verständnis von Erkrankungen wie Autoimmunenzephalitiden und Multipler Sklerose stark voranbringen und die Möglichkeit der Entwicklung neuer Behandlungen bieten.

Hierfür galt es verschiedene Fragestellungen zu bearbeiten:

1. Zunächst sollte die Expression verschiedener Gene in zwei verschiedenen MS-Läsionen eines bekannten Patienten (Patient A) mittels Multiplex-PCR untersucht werden. Unterschiede in der Genexpression in verschieden stark ausgeprägten Läsionen könnten Hinweise auf das Zusammenwirken unterschiedlichster Faktoren in den Läsionen geben und zur Klärung der Rolle bestimmter Gene und ihrer Transkripte beitragen.

2. Zudem sollte eine  $CD94^+$ - $CD8\alpha^+$  Zellpopulation aus Hirnschnitten des gleichen Patienten analysiert werden.

Ziel war es herauszufinden, welche Rolle diese  $CD94^+$ - $CD8\alpha^+$  Zellen in der Erkrankung MS spielen, ob es sich bei ihnen um unbeteiligte Zuschauer der Inflammation, Regulatoren oder aber Aggressoren handeln könnte. Dafür wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene interessierende Transkripte v. a. aus der NKG2-Familie (z. B. NKG2A) untersucht, da diese z. T. entgegengesetzte Einflüsse auf die Funktion der T-Zellen haben könnten (also sowohl aktivierend als auch hemmend). Zudem können sie auch anzeigen, ob die Zellen Antigenkontakt hatten. (Braud et al., 2003)

Es wurde ein Vergleich von LMD-isolierten  $CD94^+$ - $CD8\alpha^+$  Zellen und  $CD94^-$ - $CD8\alpha^+$  Zellen mittels RNA-Isolierung angestrebt. In Zusammenarbeit mit E. Beltran sollten diese Zellpopulationen zusätzlich einer Analyse mittels NGS zugeführt werden.

3. Parallel sollte die Suche nach dem Antigen eines expandierten T-Zell-Klons des Patienten IP2 (IP2-8S1), der im Rahmen einer Autoimmunenzephalitis gestorben war, fortgeführt werden. Ein besonderes Augenmerk sollte hierbei auf die HLA-Restriktion sowie die Längenbestimmung des Antigens gelegt werden.

Hierfür waren verschiedene Techniken angedacht:

- Verwendung alternativer antigenpräsentierender Zellen
- Testung verschiedener Kandidatenpeptide
- Anwendung von PECPL unterschiedlicher Länge

Bei den alternativen antigenpräsentierenden Zellen sollte es sich um LCL-Zellen handeln, für die im Rahmen dieser Arbeit zunächst die Optimierung der Transfektionsbedingungen im Vordergrund stand.

## Einleitung

Hinter all dem steht die grundlegende Hoffnung, durch ein besseres Verständnis der krankheitsbedingenden Faktoren und der Zielstrukturen der Autoimmunreaktionen sowohl die Diagnostik als auch die Therapie zu verbessern.



## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte und Laborausrüstung

Die für diese Dissertation verwendeten Geräte sowie deren Hersteller sind in Tabelle 2 alphabetisch aufgelistet.

**Tabelle 2: Verwendete Geräte**

Gerät	Modell und Hersteller
Blaulicht-Transilluminator:	UVT 22 BE-LED (Herolab, Wiesloch, DEU)
Bunsenbrenner:	Fireboy (Integra Biosciences AG, Zizers, CHE)
Durchflusszytometrie:	BD FACSVerse™ Flow Cytometer (Beckton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA) BD FACSAria™ Fusion (Beckton Dickinson)
Einfrier-Box/Kryo-Box:	Mr. Frosty™ (Nalgene, ThermoScientific™, Waltham, Massachusetts, USA)
Eismaschine:	Scotsman MF46 (Scotsman Ice, Mailand, ITA)
Elektroporation:	4D Nucleofector™ Core unit (Lonza, Basel, CHE) 4D Nucleofector™ X Unit (Lonza) Gene Pulser® (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornien, USA)
ELISA-Platten-Auswertung:	Wallac 1420 Victor 2™, Multilabel counter (PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, USA)
Gefrierer:	(-80 °C): Hera freeze™, HFU T series (ThermoScientific™ Waltham, Massachusetts, USA)
Gel-Dokumentation:	Quantum ST 5 (Vilber Lourmat, Eberhardzell, DEU)
Gel-Elektrophorese:	Institutswerkstatt; (Peg lab, VWR company, West Chester, Pennsylvania, USA)
Gel-Elektrophorese-Stromversorgung:	Pharmacia LKB ECPS 3000/150 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, SWE)
Heizblock:	Thermomixer Comfort (Eppendorf, Hamburg, DEU)
Inkubator:	New Brunswick™Galaxy 170R, 170S (Eppendorf) New Brunswick Galaxy 14 S (Eppendorf)
Kühlschränke:	(Liebherr, Bulle, CHE)
Magnetrührer:	KM 02 electronic motor (IKA, Staufen, DEU) MR 3001 K (Heidolph, Schwabach, DEU)
Mikroskope und Zubehör:	Wilovert S (Helmut Hund GmbH, Wetzlar, DEU) <u>Axiovert 200M (Zeiss, Oberkochen, DEU)</u> Plan-Apochromat® 5x/0.16;∞/0,17 (Zeiss) Plan-Apochromat® 10x/0,45 (Zeiss) Plan-Apochromat® 20x/0,8 (Zeiss)
Objektive:	sGFP 472/30 nm, 520/35 nm (BrightLine Fluorescence Filter, Semrock, Rochester, New York, USA) und Cy3 545/25 nm und 605/70 nm (Zeiss)
Filter:	
CCD Kamerasystem:	Coolsnap HQ (Photometrics, Tucson, AZ, USA)
Lichtquelle:	HXP 120 (Visitron Systems GmbH, Puchheim, DEU)
XYZ-Tisch:	BioPrecision2 (Ludl Electronic Products, Hawthorne, New York, USA)
Tischsteuerung:	MAC 6000 (Ludl Electronic Products)
Mikromanipulator:	LN25 Mini Unit (Luigs & Neumann, Ratingen, DEU)
Mikroinjektor:	CellTram® Vario (Eppendorf)

Objektive:	<u>Axiovert 200M (Lasermikrodissektion)</u> LD Plan-Neofluar 20x/0,40 Korr (Zeiss) LD Plan-Neofluar 40x/0,60 Korr (Zeiss)
Filter:	Filtersätze 10x basic Z FITC/GFP BP450-490 und BP 515-565; Cy3: 20x basic Z BP 546/12 und BP 575-640 (Zeiss)
CCD Kamera:	AxioCam Mrm (Zeiss)
Lampe:	Fluoreszenzlampe HXP 120 (Visitron Systems GmbH)
RoboMover:	Palm MicroBeam Z (PALM Microlaser Technologies, Bernried, DEU)
Laser LCM:	Cry Las FTSS 355-50 (Zeiss)
Mikrowelle:	Sharp (Osaka, JPN); AEG Micromat (AEG, Frankfurt am Main, DEU)
PCR-Maschinen:	Bioer Gene Touch Thermal Cycler (Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, DEU) Mastercycler®Pro vapo.protect™ (Eppendorf) Mastercycler gradient (Eppendorf) TPersonal Thermocycler (Biometra, Göttingen, DEU)
Ph-Meter:	pH521 (WTW, Weilheim, DEU)
Pipetten:	pipetman® (Gilson, Middleton, Wisconsin, USA)
Pipetten (Mehrfach-):	Eppendorf
Pipettierhelfer:	Accu jet® pro (Brand GMBH + CO KG, Wertheim, DEU)
Schüttelinkubator:	Innova® 44 Incubator Shaker Series (New Brunswick Scientific, Eppendorf)
Sicherheitswerkbank Zellkultur:	FlowSafe® B-[MaxPro]² 160 (Berner, Elmshorn, DEU)
Ultraschallgerät:	UP 200 St (Hielscher Ultraschall Technologie, Teltow, DEU)
UV-Transilluminator:	BL-312T (Bios Corporation) TI2 (Biometra)
UV-Vis Spektrophotometer:	NanoDrop™ 2000 Spectrophotometer (ThermoScientific™)
Vortexmischer:	MS1 Minishaker (IKA, Staufen im Breisgau, DEU) Vortex Genie 2 (Scientific Industries, Bohemia, New York, USA) und Bender & Hobein AG (Zürich, CHE)
Waage:	Entris 2202 1S (Sartorius, Göttingen, DEU)
Wärmebad:	GFL (Burgwedel, DEU)
Wasseraufbereitung:	Milli-Q® (Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA)
Zellzählung:	Zählkammer (Neubauer Improved, Laboroptik, Lancing, UK)
Zentrifugen:	Centrifuge 5417 R (Eppendorf) Haraeus™ Multifuge™ X3R Centrifuge (ThermoScientific™) Tischzentrifuge Sprout Minizentrifuge (Biozym Scientific)

### 2.1.2 Chemikalien, Puffer, Medien und Zusätze sowie andere Verbrauchsmaterialien

Chemikalien wurden grundsätzlich von Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA), Becton Dickinson (Franklin Lakes, New Jersey, USA), Biochrom/Merck (Darmstadt, DEU) und Gibco/Life Technologies™/Invitrogen/ThermoFisher Scientific™ (ThermoFisher Scientific™, Waltham, Massachusetts, USA), Qiagen (Hilden, DEU) und Carl Roth (Karlsruhe, DEU) bezogen.

Zellkulturutensilien wurden im Allgemeinen bei Falcon® A Corning Brand und Corning Inc. (Corning, New York, USA), Merck Millipore (Burlington, Massachusetts, USA) und Nunc™/ThermoFisher Scientific™ bestellt.

Verwendet wurden Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße u. Ä. von den Firmen Biozym (Hess. Oldendorf, DEU), Eppendorf (Hamburg, DEU) und BD Falcon (BD Biosciences/Becton Dickinson), Beckman Coulter (Brea, Kalifornien, USA), Corning Inc. und ThermoFisher Scientific™.

In einigen Experimenten wurden spezielle *low-bind* Materialien (Gefäße und Pipettenspitzen etc.) benutzt, um die Bindung von Proben (DNA/RNA) an das Material zu verringern (von Biozym und Eppendorf). Filterspitzen in Pipettenspitzen dienen dem Schutz von Proben vor Kontamination. Mehr Details zu verwendeten Puffern und Lösungen in Tabelle 3.

Tabelle 3: Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Antibiotika für Selektionierung:	Geneticin (Santa Cruz Biotech, Dallas, Texas, USA) Hygromycin B (Invitrogen, ThermoFisher Scientific™) Puromycin (Biomol, Hamburg, D) Blasticidin S (Invitrogen, ThermoFisher Scientific™)
6x DNA Auftragspuffer für Agarosegelelektrophorese:	10 mM TrisHCl (Sigma), 50 % Glycerin (v/v) (Carl Roth), Bromphenolblau 0,02 % (m/v) (Merck), Xylencyanol 0,02 % (m/v) (Bio-Rad)
Einfriermedium:	FCS (Biochrom) + 10 % (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma)
ELISA Waschpuffer:	PBS + 0,05 % Tween 20
Durchflusszytometrie Puffer:	PBS (Gibco) und 1 % FCS (Biochrom)
LB Medium:	0,1 % (m/v) NaCl (Carl Roth), 0,05 % (m/v) Hefeextrakt (BD), 0,1 % (m/v) Bacto™ Tryptone (BD), autoklaviert; gegebenenfalls + 100 µg/ml Ampicillin (Sigma) = LB Amp Medium
LB Agar:	LB Medium mit 1,5 % (m/v) Bacto™ Agar (BD), autoklaviert, + 100 µg/ml Ampicillin (Sigma) und in sterile Plastikschalen gegossen
PBS:	150 mM NaCl (Carl Roth), 8,4 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Merck), 2 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Merck)
RPMI Complete Medium:	RMPI 1640 Medium (Sigma) 10 % FCS (Fetales Kälberserum, Biochrom) 1 % Penicillin/Streptomycin (Gibco) 1 mM Sodium Pyruvat (Gibco) 1 x MEM Non-essential amino acid solution (Gibco) 2 mM L-Glutamin (Sigma 200 mM)
Stopp Medium:	RPMI 1640 (Sigma) mit 10 % FCS (Biochrom)
TBE Puffer 10x/Laufpuffer:	90 mM TrisHCl (Sigma) 90 mM Borsäure (Sigma) 2 mM EDTA (Merck)
Trypanblau-Lösung (Totfarbstoff):	0,1 % Trypan Blue Solution (Sigma) (1:4 in 1x PBS (Gibco))

Spezielle Chemikalien für PCRs u. Ä. und spezielle Kits werden, wenn nicht in Tabelle 3 oder unter 2.1.4 oder 2.1.8 aufgelistet, in den jeweiligen Abschnitten gesondert erwähnt.

### 2.1.3 Zelllinien

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zelllinien sind im Folgenden mit zusätzlichen Informationen und Angabe der Herkunft der Zellen zusammengefasst. Quelle für alle Zellen war, wenn nicht anders angegeben, K. Dornmair.

### 2.1.3.1 Eukaryotische Linien

LCL-Zellen: Als eine Form von antigenpräsentierenden Zellen (APZ) wurden durch Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus transformierte und somit immortalisierte B-Zellen, sogenannte LCL-Zellen (*Lymphoblastoid cell line*), von verschiedenen Patienten verwendet. Diese Zellen wachsen in Suspension, bilden allerdings Zellaggregate, die regelmäßig wieder verkleinert werden müssen. Die Zellen wurden unserem Labor von J. Mautner zur Verfügung gestellt.

Indexpatient 2-T-Hybridome: ausgehend von einer murinen T-Hybridomzelle ohne eigenen TZR (daher auch  $58\alpha/\beta^-$ ) (Letourneur and Malissen, 1989) wurden verschiedene Strukturen in diese Zellen transfiziert und in der Folge stabil exprimiert: die humane CD8 $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette, NFAT-sGFP (von K. Siewert und G. Rühl in der Arbeitsgruppe durchgeführt) und der TZR IP2-8S1 (von A. Plappert in der Arbeitsgruppe transfiziert). Die Zellen wachsen in Suspension und produzieren bei Aktivierung sGFP und IL-2. Die Klone IP2-8S1 Klon 3 (Weltzien), 7 (Böhmer) und 11 (Klon aus einer Reklonierung) waren von Aline Plappert eingefroren worden und wurden nun von K. Dornmair für Experimente zur Verfügung gestellt.

Jm22-Hybridomzellen (58-JM22-CD8):  $58\alpha/\beta^-$  Hybridome, die nur den T-Zell-Rezeptor JM22 sowie die humane CD8 $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette, aber nicht NFAT-sGFP stabil exprimieren, wurden in einem Experiment als Negativkontrolle verwendet, da ihnen das Plasmid zur sGFP-Expression fehlt. Es handelt sich ebenfalls um Suspensionszellen.

COS-7 Zellen: COS-7 Zellen sind adhärent wachsende Zellen aus der Niere von afrikanischen Grünen Meerkatzen, die Fibroblasten ähneln. Sie wurden mit SV40 transformiert. Die verwendeten Zellen stammen vom DSMZ und wurden von G. Rühl/K. Dornmair zur Verfügung gestellt.

Für einige Experimente wurden stabil mit dem HLA-A\*02:01 transfizierte COS-7 Zellen (COS-7-A2) verwendet.

### 2.1.3.2 E. coli

Im Rahmen der Experimente wurden zwei E. coli Stämme verwendet. Für die Transformation mittels Hitzeschock die *One Shot® TOP10 Chemically Competent E. coli* und für die Elektroporation der Stamm *ElectroMAX™ DH10B™ TI Cells*, beide von Invitrogen (ThermoFisher Scientific™).

Mehr zur Transformation unter 2.2.1.

### 2.1.4 PCR-Materialien und verwendete Primer

Primer wurden grundsätzlich bei Metabion (Martinsried, DEU) in einer Konzentration von 100  $\mu$ M bestellt. Die Primer wurden in einem Reinraum zu Beginn in kleine Aliquots aufgeteilt, um Kontaminationen vorzubeugen. Die Bestände wurden bei -20 °C gelagert. Tabelle 4 liefert eine Übersicht über die einzelnen Primer nach Anwendungsgebieten und ihre Nukleotidsequenzen.

**Tabelle 4: Verwendete Primer und ihrer Nukleotidsequenz nach Anwendungsgebieten**

Primerbezeichnung	Sequenz 5' -3'
<b>Antigensuche</b>	
pcDNA- Rev 1	ACTAGAAGGCACAGTCGAGG
pcDNA- For 1	CACTGCTTACTGGCTTATCG
pcDNA- 2nd forTOPO	CACCTCCGGCGCGCCACCATG
pcDNA- Rev 3	TGGTGATGGTGATGATGACC
pcDNA- Rev 2	CTGATCAGCGGGTTTAAACTC

<b>Genexpression bei MS</b>	
NKG2A for outer	GCATTGTTTGTCTTGTCTTGG
NKG2C for outer	TTCGAAGAACTCCAGTCTGC
NKG2D for outer	GTGGGGACTTCCCAGTTGG
NKG2E for outer	CATGCTGAACGTAACGTGTGC
NKG2F for outer	TGCAGTTTGCCTATAACCAGG
NKG2H for outer	TTGGGAAGAGAGTTTGCAGG
CD94 for outer	GAAATCCAGCCTGCTTCAGC
Infy for outer	TGCAGAGCCAAATTGTCTCC
HLA-E for outer	GTCACCCTGAGATGGAAGC
Il-10 for outer	ATCAGGGGCTTGCTCTTGC
CD3d for outer	CCTTCTCTCGCAAGTGAGC
β-Aktin for outer	TAAGGAGAAGCTGTGCTACG
NKG2A rev outer	AGGTTATTTCTGTTCAGTTGC
NKG2C rev outer	ATCATTGAAGATCCACACTGG
NKG2D rev outer	GCTACAGCGATGAAGCAGC
NKG2E rev outer	CATCTAGTTAAAAATAGGGAGG
NKG2F rev outer	CCTTGATGATCCGAAGAAGC
NKG2H rev outer	TTTATCTGATGCACTGCAAGC
CD94 rev outer	CTGTTGCTTACAGATATAACG
Infy rev outer	ATGCTCTTCGACCTCGAAAC
HLA-E rev outer	CATAGGGGAGGCGTGAGG
Il-10 rev outer	CTTGGAACCCAGGTAACC
CD3d rev outer	CAGCCTTCCAGTCTCATGTC
β-Aktin rev outer	GCAATGCCAGGGTACATGG
NKG2A rev inner	TGCTGCCTCTTTGGGTTTGG
NKG2C for inner	TTACCTTCCTCATGGATTGG
NKG2D rev inner	ACATCTTTGCTTTTGCCATCG
NKG2E rev inner	GAGTTCAAGACCAGCCTGG
NKG2F rev inner	CCTGTTTGGTTCCTGAAATGG
NKG2H for inner	CATGCTGAACGTAACGTGTGC
CD94 for inner	AGTGAGGAGCACACCGCC
Infy rev inner	CCTGTTTtagctgctggcga
HLA-E rev inner	CAAGCTGTGAGACTCAGACC
Il-10 for inner	CTCTGTTGCCTGGTCCTCC
CD3d for inner	CAGCATCACATGGGTAGAGG
CD3d rev inner	AGGAGCAGAGTGGCAATGAC
β-Aktin for inner	ACTCTTCCAGCCTTCCTTCC
<b>„Full length RNA-seq from single cells using smart-seq2“ (Picelli et al., 2014)-Protokoll</b>	
Oligo-dT <sub>30</sub> VN	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACT <sub>30</sub> VN (N jede beliebige Base, V = A, C oder G)
TSO (EXIQON, Vedbaek, DNK)	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACATrGrG+G (rG: Riboguanosin, +G: LNA (locked nucleic acid) modifiziertes G)
IS/TSO-PCR oligo (10 µM)	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT

Nachfolgend ist in Tabelle 5 noch eine Auflistung von regelhaft für Reverse Transkription und PCR verwendeten Materialien zu finden.

**Tabelle 5: Sonstiges Material für PCRs und RTs**

---

PeqGreen DNA/RNA dye (peq lab, Erlangen, DEU)
50 bp DNA ladder (Peq Gold (peq lab))
1 kb DNA ladder (New England Biolabs®, Ipswich, Massachusetts, USA)
Iproof™ HF Mastermix (Bio-Rad)
OneStep RT-PCR Kit (Qiagen):
OneStep RT-PCR Enzyme Mix (Qiagen), 5x Q-Solution (Qiagen), RNase-Free Water (Qiagen), 5x OneStep RT-PCR buffer (Qiagen), dNTPs 10 mM each (Qiagen)
RNase out (Invitrogen™, ThermoFisher Scientific™)
RNase Inhibitor (Roche Diagnostics, Risch, CHE und Clontech)
HotStarTaq® Plus DNA Polymerase 5 units/μl (Qiagen)
10x PCR Reaction Buffer (Roche Diagnostics)
Superscript® II Reverse transcriptase (Invitrogen)
Superscript II first-strand buffer (Invitrogen)
DTT (100 mM) (Invitrogen)
dNTP mix (10 mM je) (Fermentas, ThermoFisher Scientific™)
Betaine (5 M) (Sigma-Aldrich)
KAPA HiFi HotStart ReadyMix 2x (KAPA Biosystems, Hoffmann- La Roche, Basel, CHE)
MgCl <sup>2</sup> (Sigma-Aldrich)
DEPC treated water (Invitrogen, life technologies)
Ambion ® Nuclease- free water (not DEPC treated) (Invitrogen)

### 2.1.5 Software

Im Rahmen dieser Dissertation wurden die in Tabelle 6 aufgeführten Programme verwendet.

**Tabelle 6: Verwendete Software**

---

Durchflusszytometrie: BD FACSuite v.1.0.5.3841
Auswertung der Durchflusszytometriedaten: FlowJo V10 Vx0.7, FlowJo X 10.0.7r2, Testversion FlowJo10.6.0 (Tree Star Inc., Ashland, Oregon, USA)
Mikroskop und APZ-Isolierung: Metamorph 7.7.4.0 (Molecular Devices, Sunnyvale, Kalifornien, USA)
Mikroskopie-Bildbearbeitung: ImageJ: 1.51h, Java 1.8.0_66, 64 bit (NIH, Bethesda, Maryland, USA); Microsoft Paint (Microsoft, Redmond, Washington, USA)
ELISA Auswertung: Microsoft Excel 2010
Sequenzanalyse: Chromas Version 2.6.2 (Technelysium Pty Ltd., South Brisbane, AU)
Texterstellung: Microsoft Word 2010
LCM: PalmRobo 4.6 Pro 64bit (Zeiss)
Literaturverwaltung: EndNote X8 (Clarivate Analytics, Philadelphia, Pennsylvania, USA)

### 2.1.6 Antikörper

Antikörper wurden in dieser Arbeit für verschiedene Zwecke eingesetzt: zum einen zum Färben von Zellen im Rahmen der Durchflusszytometrie, zum anderen zur Durchführung von Immunhistochemie und darüber hinaus zur Aktivierung von Zellen. Eine Übersicht über die verwendeten Antikörper und ihre Eigenschaften geben Tabellen 7 und 8.

**Tabelle 7: Für die Durchflusszytometrie verwendete Antikörper**

Name und Firma	Kanal/konjugiertes Fluorophor	Anwendung	Klon	Konzentration	Spezies/Isotyp	Spezifität
TO-PRO®-3, Invitrogen	APC-Kanal	Färbung toter Zellen		1 mM in DMSO (1:4000-1:6000)		
PI (Propidiumiodid), Sigma	PE-Kanal	Färbung toter Zellen		1 mg/ml in PBS (1:500)		
CD 8 Sk 1, BD Biosciences	APC	Kontrolle der CD8 Expression	Sk 1	50 µg/ml	Maus BALB/c IgG <sub>1</sub> , κ	humanes CD8α
IgG <sub>1</sub> κ Isotype, BD Pharmingen™, BD Bioscience	APC	Isotyp-Kontrolle	MOPC-21		Maus IgG <sub>1</sub> , κ	
Hamster Anti Mouse CD3e, BD Pharmingen™	FITC	Kontrolle der CD3 Expression	145 2c11	0,5 mg/ml	Hamster IgG <sub>1</sub> , κ	murines CD3e
IgG <sub>1</sub> κ Isotype control, BD Pharmingen™	FITC	Isotyp-Kontrolle	A19-3	0,5 mg/ml	Hamster IgG <sub>1</sub> , κ	
Anti mouse CD3e, eBioscience, ThermoFisher Scientific™	APC	Kontrolle der CD3 Expression	1452C11	0,2 mg/ml	Hamster IgG	murines CD3e
Arm Ham IgG Isocontrol, eBioscience	APC	Isotyp-Kontrolle	e Bio299 Arm	0,2 mg/ml	Hamster IgG	

**Tabelle 8: Für die Immunhistochemie verwendete Antikörper**

Name und Firma	konjugiertes Fluorophor	Anwendung	Klon	Konzentration	Spezies/Isotyp	Spezifität
CD 94, BD Pharmingen™		Färbung von CD94 in humanen Hirnschnitten	HP-3D9	0,5 mg/ml	Maus IgG <sub>1</sub>	humanes CD94
Alexa Fluor® 488, life technologies™, ThermoFisher Scientific™	Alexa Fluor® 488	Sekundärer Ak, Färbung von CD94 in humanen Hirnschnitten		2 mg/ml	Ziege IgG	murines IgG
CD 8, Bio-Rad (Cy3 konjugiert mit Amersham Cy3 MAb labeling kit, GE Healthcare Life Sciences)	Cy3	Färbung von CD8α in humanen Hirnschnitten	LT8		Maus IgG <sub>1</sub>	humanes CD8α

**Weitere Ak:** CD3-Aktivierung: *Anti mouse CD3e Purified, Armenian hamster/ IgG*,

Klon 145 2C11 (eBioscience), 0,5 mg/ml

### 2.1.7 Verwendete Plasmide

Eine Übersicht über die verwendeten Plasmide und ihre Eigenschaften findet sich in Tabelle 9. Sie wurden von K. Dornmair und J. Malotka für die Experimente zur Verfügung gestellt.

**Tabelle 9: Verwendete Plasmide**

Plasmidbezeichnung	Größe in kB	Resistenzgene	Verwendung
pcDNA-NFAT-sGFP	7,4	Ampicillin, Blasticidin	Expression von sGFP in COS-7 Zellen
pcDNA 6/V5-His A	5,1	Ampicillin, Blasticidin	Leerplasmid als Negativkontrolle bei Transfektionen
pcDNA- Kandidaten pcDNA- GYGQGAGTL pcDNA- GYGQGAGAL pcDNA- NLDSTTVAI	5,1	Ampicillin, Blasticidin	Expression von Kandidatenpeptiden von IP2-8S1
pcDNA- N27 (PECP9X)	5,1	Ampicillin, Blasticidin	PECP, kodiert für 9 AS lange Peptide mit zufälliger Zusammensetzung
pcDNA- N24 (PECP8X)	5,1	Ampicillin, Blasticidin	PECP, kodiert für 8 AS lange Peptide zufälliger Zusammensetzung
Ptt5 sGFP	4,4	Ampicillin	Expression von sGFP in LCL- Zellen
Ptt5 GABA	4,4	Ampicillin	Expression der $\alpha_1$ - GABA <sub>A</sub> -Rezeptor Untereinheit in LCL- Zellen
Ptt5 CSRP2	4,4	Ampicillin	Expression von CSRP2 in LCL-Zellen
RSV neo GABA tags	5,1	Neomycin, Ampicillin	Expression der $\alpha_1$ - GABA <sub>A</sub> -Rezeptor Untereinheit in LCL- Zellen
RSV neo sGFP	5,1	Neomycin, Ampicillin	Expression von sGFP in LCL-Zellen
pHSE3'neo -  HLA-A*02:01, HLA- A*23:01, HLA-B*44:03, HLA-B*35:01, HLA- C*04:01, HLA-C*16:01	10,2	Neomycin, Ampicillin	Expression der IP2 HLA-Moleküle in APZ

### 2.1.8 Kits und Reagenzien

In Tabelle 10 sind verwendete Kits und Reagenzien aufgeführt, jeweils unter Angabe des Anwendungsgebietes und der Herstellerinformationen.



**Tabelle 10: Verwendete Kits und Reagenzien**

<b>Anwendung</b>	<b>Bezeichnung und Hersteller</b>
FuGENE®	FuGENE® HD Transfection Reagent (Promega, Madison, Wisconsin, USA)
Gelextraktion	MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen)
Illumina Sequenzierung	Nextera XT DNA sample preparation kit (Illumina, San Diego, Kalifornien, USA)
Klonierung	pcDNA™ 3.1 Directional TOPO® Expression Kit (Invitrogen)
Nukleofektion	Nucleofector Kits SE/SF Amaxa™ cell line 4D Nucleofector™ X Kit L (Lonza)
PCR Aufreinigung	QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen)
Plasmidaufreinigung	QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen)
RT-PCR	OneStep RT PCR Kit (Qiagen) Superscript II

## 2.1.9 Patientenmaterial und Gewebeproben

### 2.1.9.1 Patient A

Der in der Einleitung vorgestellte Patient A wurde nach Fehldiagnose eines Glioms operativ versorgt, wobei die fragliche Läsion entfernt wurde. Diese erwies sich in der Pathologie jedoch als MS-Läsion. (Skulina et al., 2004) Teile des entfernten Hirnmaterials wurden in Flüssigstickstoff überführt. Somit bietet sich anhand dieser Probe die Möglichkeit, eine beachtliche Menge Hirngewebe aus einer frühen, unbehandelten Phase der Erkrankung Multiple Sklerose zu untersuchen. Eine Reihe an Untersuchungen wurde bereits in der Vergangenheit an Proben dieses Patienten durchgeführt. (siehe 1.1.4.1.2.2)

Für die vorliegende Dissertation wurden sowohl EBV transformierte B-Zellen (LCL-Zellen) dieses Patienten (hier FE genannt) als auch Hirnschnitte aus dem Gebiet 10A und RNA isoliert aus Hirnschnitten aus den Regionen 12b und 10A verwendet. (zur Einteilung der Regionen siehe 1.1.4.1.2.2)

### 2.1.9.2 Indexpatient 2

#### 2.1.9.2.1 Krankheitsverlauf

Der T-Zell-Klon, dessen Antigen im Rahmen dieser Dissertation gesucht wurde, stammt aus dem Gehirn des sogenannten Indexpatienten 2 (kurz IP2). Der männliche, 51-jährige Patient fiel durch Verhaltensänderungen, Depression und Psychose auf, erlitt dann epileptische Anfälle und starb schließlich an einer Sepsis. In seinem Serum wurden Antikörper gegen die  $\alpha_1$ - und  $\beta_3$ -Untereinheit des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors gefunden, in seiner Cerebrospinalflüssigkeit ebenfalls Antikörper gegen die  $\alpha_1$ -Untereinheit. (Petit-Pedrol et al., 2014) Es handelte sich bei seiner Erkrankung somit um eine Autoimmunenzephalitis und genauer um eine Anti-GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Enzephalitis (kurz GABA<sub>A</sub>-R-Enzephalitis).

#### 2.1.9.2.2 Entstehung des Klons IP2-8S1 und HLA-Bestimmung

Im Rahmen ihrer Dissertation in der Arbeitsgruppe Dornmair analysierte A. Plappert das T-Zell-Repertoire in verschiedenen Hirnregionen von IP2. Dabei stieß sie auf den expandierten Klon IP2-

8S1, der sowohl in der CSF expandiert war, als auch im Sulcus lateralis und im Hippocampus nachweisbar war. Es ist somit davon auszugehen, dass der T-Zell-Klon IP2-8S1 an der Entstehung der Krankheit beim Patienten IP2 beteiligt war. (Plappert, 2016)

Die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette von IP2-8S1 wurden in  $58\alpha/\beta^-CD8^+NFAT$ -sGFP Zellen transfiziert, die von K. Siewert und G. Rühl hergestellt worden waren. Des Weiteren führte A. Plappert die HLA-Typisierung von IP2 durch, die für die Antigen-Suche von entscheidender Bedeutung ist. (Plappert, 2016)

Es ergab sich die in Tabelle 11 dargestellte MHC-I-Kombination.

**Tabelle 11: HLA-Typisierung von IP2**

Gen	Allel 1	Allel 2
HLA-A	*02:01	*23:01
HLA-B	*35:01	*44:03
HLA-C	*04:01	*16:01

Es müssen somit sechs mögliche HLA-Formen bei der Antigensuche für IP2 berücksichtigt werden.

Plappert begann mit der Antigen-Suche mittels kombinatorischer Peptid-Bibliotheken, konnte jedoch keine eindeutige HLA-Restriktion von IP2-8S1 nachweisen. Festgestellte Aktivierung verlor sich im Laufe der Experimente.

## 2.2 Mikrobiologische Methoden

### 2.2.1 Transformation E. coli

Zur Transformation der E. coli wurden zwei Methoden verwendet. Einerseits die Transformation mit Hitzeschock, andererseits die Elektroporation.

#### 2.2.1.1 Hitzeschock

Die *One Shot® TOP10 Chemically Competent* (Invitrogen) E. coli, deren Lagerung bei -80 °C erfolgte, wurden auf Eis aufgetaut. Dann wurden 1,5 µl bis 2 µl der DNA-Probe zugegeben und die Mischung für weitere 30 min auf Eis inkubiert. Die Aufnahme der DNA wurde durch den nachfolgenden Hitzeschock unterstützt. Dieser erfolgte bei 42 °C für 30 Sekunden im Wasserbad. Die E. coli wurden anschließend sofort für 2 min auf Eis zurück gestellt, bevor 250 µl S.O.C Medium (Invitrogen) zugegeben wurden.

Danach wurden die transformierten E. coli für 1 Stunde bei 37 °C im Schüttelinkubator inkubiert, ehe sie je nach transformiertem Plasmid z. B. in LB Amp Medium (1:1000) überführt wurden.

Nach einer Nacht im Schüttelinkubator bei 37 °C konnte am nächsten Tag eine Mini-Prep zur Isolierung des gewünschten Plasmids durchgeführt werden.

#### 2.2.1.2 Elektroporation

Für die Antigensuche wurden die Kandidatenpeptide in *ElectroMAX™ DH10B™ T1* (Invitrogen) Zellen per Elektroporation transformiert, um sie nach der Mini-Prep (siehe 2.5.2.3) dann wieder in APZ transfizieren zu können. Durch die angelegte elektrische Spannung wurde die Zellmembran der Bakterien kurzzeitig permeabel.

Die Einstellungen am Gerät (*Gene Pulser*®, Bio-Rad) am Max-Planck-Institut (Planegg) waren: 200 Ohm, 25 µF, 2,00 kV.

Alle Materialien waren vorgekühlt. 20 µl auf Eis aufgetaute Bakterien wurden mit dem resolubilisierten Ligat (2 µl, siehe 2.5.4.10) gemischt, in den Spalt der *Gene Pulser* Elektroporationsküvette überführt und im Gerät transformiert.

Daraufhin wurden die transformierten Bakterien mit 1 ml S.O.C Medium (Invitrogen) versetzt und in ein passendes Gefäß überführt. Es folgte 1 Stunde bei 37 °C im Schüttelinkubator, bevor von 1 ml 10 µl mit 490 µl LB Amp Medium verdünnt wurden. Davon wurden 50 µl auf einer LB Amp Agarplatte ausplattiert. Die hierauf wachsende Kolonienanzahl multipliziert mal dem Faktor 1000 entsprach der tatsächlichen Kolonienanzahl. Die restlichen Bakterien wurden in 20 ml LB Amp Agar Medium über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator aufbewahrt, bevor die Mini-Prep durchgeführt wurde. Der Rest der Bakterien konnte bei 4 °C gelagert werden.

## 2.3 Zellkultur basierte Methoden

### 2.3.1 Kulturbedingungen

Allgemein wurden die Zelllinien bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in *RPMI Complete Medium* mit entsprechenden Zusätzen bzw. Selektionsantibiotika inkubiert.

Grundsätzlich werden zwei Sorten Zellen in der Zellkultur unterschieden: adhärenzte Zellen und Suspensionszellen. Aus dem Wachstumsmuster ergaben sich einige Unterschiede in der Kultur, die im Nachfolgenden jeweils berücksichtigt werden.

### 2.3.2 Einfrieren und Auftauen von eukaryotischen Zellen

Für die Kryokonservierung wurden die Zellen in der Zentrifuge bei 300 g für 5 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Wenn nicht anders erwähnt, fanden alle Zentrifugationsschritte in der Zellkultur unter diesen Bedingungen statt. Danach wurde der Überstand abgesaugt und die Zellzahl mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Pro Kryoröhrchen (*CryoTube*™, ThermoScientific™) wurden mindestens  $1,0 \times 10^6$  Zellen in 1 ml Einfrier-Medium (FCS mit 10 % DMSO, steril gefiltert) resuspendiert. Das DMSO im Gefriermedium schützt die Zellen vor Schäden durch das Einfrieren. Bei COS-7 Zellen waren es pro *CryoTube*™  $1,5 \times 10^6$  Zellen.

In einer geeigneten Styroporbox oder einem Gefrierbehälter (*Mr. Frosty*™, Nalgene, ThermoScientific™) gefüllt mit Isopropanol wurden die Zellen zunächst langsam auf -80 °C heruntergekühlt. Der Gefrierbehälter ermöglichte eine Abkühlung von -1 °C pro Stunde. Nach 48 Stunden wurden die Zellen zur dauerhaften Lagerung in flüssige Stickstofftanks (*CryoPlus2*, ThermoScientific™) mit einer Temperatur von -194 °C überführt.

Beim erneuten Auftauen wurden die Röhrchen nach der Entnahme aus dem Stickstofftank bei 37 °C aufgetaut und die Zellen dann in ein Zentrifugenröhrchen mit *RPMI Complete Medium* überführt. Danach wurden sie bei 300 g für 5 min bei 4 °C zentrifugiert, um restliches zellschädigendes DMSO aus dem Gefriermedium zu entfernen. Der Überstand wurde nach dem Zentrifugieren abgesaugt und das Zellpellet mit einer entsprechenden Menge Medium resuspendiert.

Die Zellen wurden entweder in eine Zellkulturflasche überführt (COS-7) oder in Form einer Verdünnungsreihe zunächst in einer 24-Well-Platte aufbewahrt. Nach dem Auftauen benötigten die Zellen in der Regel etwa 2 Tage um sich zu erholen. Ihr Zustand konnte unter dem Mikroskop beurteilt werden. Anschließend konnte mit der Selektion durch Antibiotika oder mit Experimenten begonnen werden.

### 2.3.3 Selektion

Bei den T-Hybridomzellen des Indexpatienten 2 wurde eine Vierfach-Selektion mit G418, Hygromycin, Blasticidin und Puromycin durchgeführt. Dies diente der Sicherstellung, dass nur Zellen, die weiterhin die vier gewünschten Strukturen und damit Antibiotikaresistenzen stabil exprimieren (siehe Tabelle 12), in Kultur bleiben.

**Tabelle 12: Selektionsantibiotika und selektierte Strukturen sowie finale Konzentration im Medium**

TZR- $\alpha$ Kette (pRSVhygro)	Hygromycin B (Invitrogen, ThermoFisher Scientific™), 0,3 mg/ml
CD8 $\alpha$ - $\beta$ (virales Konstrukt)	Puromycin (Biomol, Hamburg, Deutschland), 1,0 $\mu$ g/ml
pcDNA-NFAT-sGFP	Blasticidin S (Invitrogen Carlsbad, USA), 3,0 $\mu$ g/ml
TZR- $\beta$ Kette (pRSV.neo), HLA-Moleküle	Geneticin (G418) Sulfat (Santa Cruz Biotech, Dallas, Texas, USA), 1,5 mg/ml

Am schonendsten für die Zellen war es, nach dem Auftauen schrittweise die entsprechenden Antibiotika zum *RPMI Complete Medium* zuzugeben, bis das sogenannte „GHPB“ (G418, Hygromycin, Puromycin, Blasticidin) Medium erreicht war, in dem sie dann weiter in Kultur gehalten wurden.

Die JM22-Zellen erhielten dieselben Selektionsantibiotika entsprechend der transfizierten Strukturen. Stabil transfizierte COS-7-A2 Zellen erhielten 1,5 mg/ml G418 zu ihrem *RPMI Complete Medium*.

### 2.3.4 Subkultivierung von adhärennten Zellen und Suspensionszellen

Zur Loslösung von adhärennten Zellen wurde zunächst das gesamte Zellmedium entfernt. Danach wurde zwei Mal mit PBS gespült, um tote Zellen, Debris und restliches Medium zu beseitigen, das die Wirkung von Trypsin hemmen würde.

Anschließend wurde für eine große Zellkulturflasche (175cm<sup>2</sup>) 8 ml Trypsin EDTA zugeben und die Flasche für 8-10 min in den Inkubator bei 37 °C gelegt, bis sich unter dem Mikroskop alle Zellen gelöst vom Boden zeigten.

Danach wurden 16 ml Stopp Medium auf die Zellen gegeben, um die proteolytische Wirkung des Trypsins zu beenden. Durch auf- und abpipettieren wurden Zellklumpen aufgelöst.

Die Zellen wurden in einem Zentrifugenröhrchen in die Zentrifuge überführt und bei vorgenannten Einstellungen zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen wurden in Medium resuspendiert und bei Bedarf gezählt. Die Zellen wurden dann für weitere Experimente verwendet oder anteilig zurück in Kultur genommen.

Die Subkultivierung von Suspensionszellen (JM22, LCL-Zellen, IP2-T-Hybridome) erfolgte entweder durch Austausch eines Teils der Zellsuspension gegen frisches Medium oder durch Abzentrifugieren, Resuspendieren und Zählen der Zellen, bevor ein Teil für Versuche oder die Kultur weiterverwendet wurde.

### 2.3.5 Zellzahlbestimmung mit der Neubauer-Zählkammer

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde ein Aliquot der resuspendierten Zellen mit Trypanblau gemischt und an den Rand der Deckplatte der Zählkammer (Neubauer Improved, Laboroptik, Lancing, GB) pipettiert (z. B. 20 µl Zellsuspension zu 20 µl Trypanblau, entsprechend einem Verhältnis von 1:2, Verdünnungsfaktor: 2). Die Flüssigkeit wurde dann durch Kapillarkraft eingesogen. Tote Zellen färbten sich in Folge ihrer geschädigten Zellmembran blau. Dies ermöglichte eine Abgrenzung von lebenden Zellen, die sich nicht anfärbten.

Die Auszählung der Quadranten erfolgte unter dem Mikroskop. Die Zellzahl ließ sich wie folgt berechnen:

$$\frac{\text{gezählte Zellzahl}}{4} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

Das Ergebnis wurde  $\times 10^6$  pro ml angegeben.

### 2.3.6 Transfektion von Zellen zur transienten Proteinexpression

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Wege der Transfektion zur transienten Proteinexpression angewendet: Transfektion mit FuGENE® HD und mittels Nukleofektion.

Bei beiden Reagenzien (FuGENE® HD und Nucleofector Lösung) wurde darauf geachtet keine *Low-Bind* Laborprodukte wie Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße zu benutzen, um mögliche Störwirkungen auf die Transfektion zu vermeiden.

Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz einer Transfektion konnte sowohl bei FuGENE® als auch Nukleofektion parallel als Positivkontrolle ein GFP-kodierendes Plasmid (z. B. pcDNA-sGFP bei COS-7 Zellen oder ptt5 sGFP bei LCL-Zellen) transfiziert werden, dessen Expression in den Folgetagen leicht unter dem Fluoreszenzmikroskop oder per Durchflusszytometrie überprüft werden konnte.

#### 2.3.6.1 FuGENE®

Für die Transfektion mittels FuGENE® HD *Transfection Reagent* wurden 500 000 COS-7 Zellen in 3 ml *Complete Medium* in eine 3,5 cm Kultivierungsschale vorgelegt und mindestens drei Stunden bei 37 °C inkubiert. Die zu verwendenden Plasmide, das FuGENE®-Reagenz und *RPMI 1640 Medium* wurden auf Raumtemperatur gebracht. In einem 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden 2 µg Plasmid-DNA zu *RPMI 1640 Medium* zugegeben, sodass ein Gesamtvolumen von 100 µl erreicht wurde.

7 µl des FuGENE® HD *Transfection Reagent* wurden zu dem Plasmid/Medium Mix beigemischt und der Ansatz bei Raumtemperatur 10-15 Minuten inkubiert. Dann wurde der Transfektionsansatz auf die Schale mit den vorbereiteten COS-7 Zellen gegeben und durch kreisende Bewegungen der Schale verteilt.

#### 2.3.6.2 Nukleofektion

##### 2.3.6.2.1 COS-7 Zellen

Allgemein wurde für die Transfektion mit dem Nucleofector bei COS-7 Zellen wie folgt vorgegangen: Nachdem die Zellen am Vortag der Transfektion nach Bedarf subkultiviert worden waren, wurden die Zellen erneut gewaschen, trypsinisiert, gestoppt, zentrifugiert und dann gezählt.

Je  $1,0 \times 10^6$  Zellen wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Diese wurden bei 20 °C und 100 g 10 Minuten lang zentrifugiert.

In der Zwischenzeit wurde der Transfektionsansatz aus 100 µl SE Lösung (nach Herstellerangaben mit Supplement versetzt, auf Raumtemperatur) und je 2 µg Plasmiden pro Reaktion hergestellt.

Die Plasmidmenge teilte sich in der Regel je zur Hälfte (je 1 µg) auf eine Probe wie eine PECP-Bibliothek und auf entsprechende HLA-Moleküle auf. Der Überstand wurde von den Zellen komplett entfernt und diese wurden mit der Transfektionsmischung resuspendiert. Mit der Pipette wurden die Zellen als nächstes in den Schlitz der Nucleofector-Küvetten überführt und in der 4D-Nucleofector X Unit mit dem Programm CM 130 transfiziert.

Danach ruhten die Zellen 10 min bei Raumtemperatur, bevor je Küvette 0,5 ml vorgewärmtes *Complete Medium* dazu gegeben wurden.

Nach weiteren 10 min bei Raumtemperatur wurden die Zellen mit den mitgelieferten Einmalpipetten von Lonza in die 3,5 cm Kultivierungsschalen (Falcon®, 35x10 mm) überführt, die zuvor mit 2,5 ml vorgewärmtem (37 °C) Medium vorbereitet worden waren. In der Folge wurden die Zellen über Nacht im Inkubator bei 37 °C inkubiert.

### 2.3.6.2.2 LCL-Zellen

Die Transfektion von LCL-Zellen erfolgte prinzipiell wie für COS-7 Zellen beschrieben. Hier wurden pro Ansatz in der Regel  $2,0 \times 10^6$  Zellen transfiziert. Diese wurden mit SF (bzw. anfangs zu Testzwecken auch mit SG, siehe hierzu 3.2.2.1.2.1) Lösung und den gewünschten Plasmiden (2 µg) resuspendiert.

Das Programm wurde im Nucleofector mit EH 100 (bzw. DS 104 für die Lösung SG) gewählt.

Nach dem oben beschriebenen Vorgang wurden sie, wenn nicht anders angegeben (siehe unten), in 2 ml Reaktionsgefäße, die 1,2 ml warmes *Complete Medium* enthielten, offen über Nacht im Inkubator gelagert.

Am nächsten Tag konnte nach Aufwirbelung ein Teil des zellulären Detritus abpipettiert werden. Die Zellen konnten dann in gewünschte Zellkulturflaschen oder Platten überführt werden.

Beim ersten Test der Transfektion wurden die Zellen nach der Transfektion noch nicht in 2 ml Reaktionsgefäße überführt, sondern direkt in kleine Zellkulturflaschen mit vorgewärmtem Medium. Debris wurde zudem am nächsten Tag nicht durch Aufwirbelung und Abpipettieren entfernt.

In den Tagen nach Transfektion konnte, wenn sGFP als Kontrolle mittransfiziert worden war, die Transfektionseffizienz und Vitalität der Zellen leicht in der Durchflusszytometrie und unter dem Fluoreszenzmikroskop beurteilt werden.

### 2.3.7 Ansätze zur Aktivierung von T- Hybridomzellen

#### 2.3.7.1 CD3-Aktivierung

Über den TZR-CD3-Komplex lässt sich die Aktivierbarkeit der verwendeten T-Hybridomzellen bestimmen.

Hierfür wurden auf 150 µl PBS 1 µl CD3e Anti-Maus Antikörper (eBioscience) in eine 96-Well-Platte gegeben. Im Inkubator wurde das Well über 3 Stunden beschichtet, bevor die PBS wieder abgesaugt wurde und 30 000-100 000 Hybridomzellen in Medium hinzugeben wurden. Ebenso wurde in einem benachbarten Well die gleiche Anzahl von Zellen als Negativkontrolle eingegeben.

Die Auswertung erfolgte nach 16 Stunden Inkubation unter dem Fluoreszenzmikroskop. Die Hybridome produzieren bei Aktivierung über den NFAT-Signalweg sGFP, das so als Aktivierungsmarker detektiert werden konnte, und auch IL-2. Bei Bedarf konnte somit zusätzlich ein IL-2 ELISA und eine Analyse mittels Durchflusszytometrie auf sGFP durchgeführt werden.

### 2.3.7.2 Aktivierung durch antigenpräsentierende Zellen

Eine weitere Möglichkeit zur Aktivierung von Hybridomzellen besteht darin, sie in Kokultur mit antigenpräsentierenden Zellen (APZ) zu setzen. Dafür wurden im Rahmen dieser Dissertation zum einen COS-7 Zellen und zum anderen LCL-Zellen verwendet.

#### 2.3.7.2.1 LCL-Zellen als antigenpräsentierende Zellen

##### 2.3.7.2.1.1 Endogene Peptide und EBV-Antigene

Als antigenpräsentierende Zellen wurden EBV transformierte B-Zellen, sogenannte LCL-Zellen (=B-Lymphoblastoide Zelllinie, siehe 2.1.3.1) verschiedener Patienten verwendet, deren HLA-Konstellationen und GFP-Expressionsprofil in Tabelle 13 zusammengefasst sind.

**Tabelle 13: Name der LCL-Zelllinie und HLA-Typisierung sowie GFP-Expressionsprofil (Quelle: persönliche Kommunikation mit K. Dornmair und aus Plappert, 2016)**

Nummerierung und Name der Zelllinie	HLA-A*	HLA-B*	HLA-C*	endogene GFP-Expression = (+)
1 KK	01:01, 23:01	50:01, 57:02	06:02, 18	(+)
2 43	02:01, 23:01	18:01, 44:03	04:01, 07:01	
3 JM	02:01, 03:01	15:29, 51:01	12:03, 14:02	(+)
4 FE	01:01	08:01	07:01	
5 36	24:03, 29:02	18:01, 44:03	12:03, 16:01	(+)
6 lbi	11:01, 24:02	18:01, 51:01	04:01, 07:01	(+)
7 TG	23:01, 24:02	07:02, 07:05	07:02, 15:05	(+)
8 28	29:02, 30:01	42:01, 44:03	16:01, 17:01	
9 17490	02:01, 03:01	35:01, 40:01	03, 04:01	
10 16488	02:01, 26:01	08:01, 38:01	07:01, 12:03	

Die ersten Kokulturen erfolgten mit allen 10 aufgeführten untransfizierten LCL-Zelllinien.

Für LCL-Zellen soll ein enger Zell-Zell-Kontakt förderlich sein, deswegen wurden für die Kokultur mit IP2-Hybridomzellen 50 000 Zellen je LCL-Klon in eine 96-Well-Rundbodenplatte vorgelegt. Eine Auswertung unter dem Fluoreszenzmikroskop war dadurch und durch die teils endogene Expression von GFP in manchen LCL-Zelllinien nicht durchführbar. (siehe Tabelle 13) Mikroskopisch wäre es nicht sicher möglich gewesen, zu unterscheiden, ob es sich um aktivierte sGFP-exprimierende T-Hybridome oder lediglich einen endogen GFP-exprimierenden LCL-Klon handelt.

Zu den LCL-Zellen wurden je 30 000 T-Hybridomzellen gegeben und diese leicht mit der Pipette dazu gemischt, um einen optimalen Zellkontakt zu ermöglichen.

Der Versuch wurde insgesamt zwei Mal durchgeführt. Die Kokultur wurde beide Male nach 16 Stunden ausgewertet, indem der Überstand beim ersten Mal für einen IL-2 ELISA verwendet wurde und die Zellen zusätzlich beide Male in der Durchflusszytometrie analysiert wurden.

Um T-Hybridome sicher von den LCL-Zellen unterscheiden zu können, wurden sie für die Durchflusszytometrie mit einem APC gelabelten CD3-Ak gefärbt. (siehe 2.1.6) Dies war essentiell, da

die LCL-Zellen teils wie erwähnt auch endogen GFP exprimieren und anhand von Größe und Granularität (FSC, SSC, siehe 2.4.1) in der Durchflusszytometrie nicht eindeutig von T-Hybridomen unterschieden werden konnten.

Aktivierte T-Hybridome wären also FITC und APC positiv und könnten so von GFP-exprimierenden LCL-Zellen unterschieden werden. Um tote Zellen zu identifizieren und aus der Analyse auszuschließen wurde zusätzlich PI verwendet.

Als Positivkontrolle wurde eine CD3-Aktivierung der T-Hybridome mitanalysiert. Als Negativkontrolle, zur Abgrenzung echter Aktivierung von Spontanaktivierung, dienten T-Hybridome, die nicht in Kokultur gesetzt worden waren, sowie eine Kokultur mit der LCL-Linie FE. Die Linie FE hat keine HLA-Übereinstimmung mit dem Indexpatienten 2 und sollte diesen somit im Regelfall nicht aktivieren können.

Näheres zur Durchflusszytometrie siehe 2.3.8.3 und 2.4.1. Der ELISA wird in 2.3.8.1 beschrieben.

### **2.3.7.2.1.2 CSRP2 und $\alpha_1$ -GABA<sub>A</sub>-Rezeptor**

In einem leicht abgewandelten Versuch wurden die LCL-Zelllinien zunächst mit zwei Plasmiden einzeln transfiziert. Dann wurden die transfizierten Zellen wie unter 2.3.7.2.1.1 beschrieben für die Kokultur mit den T-Hybridomzellen verwendet, um zu sehen, ob prozessierte Produkte dieser transfizierten Proteine die T-Zellen aktivieren.

Transfiziert wurden hierfür zunächst ptt5 sGFP als Transfektionskontrolle und ptt5 CSRP2 und RSV neo-GABA ( $\alpha_1$ -Untereinheit des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors) wie unter 2.3.6.2.2 beschrieben. Für diese Kokultur wurden ebenfalls alle 10 LCL-Zelllinien verwendet. Sie wurde zweimal angesetzt, einmal 28 h nach Transfektion der LCL-Zellen und einmal 52 h nach Transfektion. Als Positivkontrolle diente jeweils eine CD3-Aktivierung für die Aktivierbarkeit des T-Zellklons und als Kontrolle des Transfektionserfolges wurden ptt5 sGFP Transfektanten der Zelllinien FE bzw. 28 und 17490 verwendet. Als Negativkontrolle wurden T-Hybridome ohne LCL-Zellen sowie die LCL-Zelllinie FE in Kokultur mit T-Hybridomen eingesetzt, da diese keine HLA-Übereinstimmung mit dem Indexpatienten 2 hat, und ihn somit nicht aktivieren können sollte.

Die Auswertung erfolgte entsprechend der Kokultur mit untransfizierten LCL-Zellen mittels ELISA und Durchflusszytometrie nach jeweils 16 Stunden. Die erste Transfektion und Kokultur erfolgte in Kooperation mit G. Rühl.

Der Versuch wurde mit ptt5 GABA und ptt5 CSRP2 transfizierten Zellen von 8 LCL-Linien (ohne die Zelllinien JM und 43) wiederholt. Auch mit 8 Klonen war das HLA-Repertoire von IP2 komplett abgedeckt, deswegen konnte auf Klone mit redundanten HLA-Molekülen verzichtet werden. Dieses Mal wurden die Kokulturen erst 52 Stunden und 76 Stunden nach Transfektion der LCL-Zellen angesetzt, das weitere Vorgehen war analog zu oben beschriebenem Procedere.

Insgesamt fand also eine Analyse zu vier Zeitpunkten statt.

### **2.3.7.2.2 COS-7 Zellen als antigenpräsentierende Zellen**

#### **2.3.7.2.2.1 PECP-Bibliotheken und erste Runde Isolierung**

Die COS-7 Zellen wurden für die unvoreingenommene Antigensuche mit dem Ziel der Mimotopidentifizierung mit 1 µg des gewünschten MHC-I-Komplexes von Patient IP2 und 1 µg der Probe, z. B. einer der PECP-Bibliotheken wie N24 oder N27, kotransfiziert. Ebenso konnten stabil mit



ausgewählten HLA-Molekülen transfizierte COS-7 Zellen (z. B. COS-7-A2) verwendet werden, in die dann nur noch die PECP-Bibliothek transfiziert wurde, wie in 2.3.6.2.1 beschrieben.

Zu einem Teil dieser Experimente wurden gesonderte Negativkontrollen mitgeführt. Dabei handelte es sich in der Regel um eine Kokultur von T-Hybridomzellen mit COS-7 Zellen, in die die gleichen HLA-Moleküle wie in die Probe, dazu aber statt der PECP-Bibliothek ein sogenanntes Leerplasmid transfiziert worden war.

Eine weitere Kontrollmöglichkeit war die Verwendung von COS-7 Zellen, in die lediglich die IP2 HLA-Moleküle transfiziert worden waren. Die IP2 HLA-Moleküle wurden dabei in Paaren (d. h. HLA-A\*02:01 und HLA-A\*23:01 zusammen, HLA-B\*35:01 und HLA-B\*44:03 oder HLA-C\*04:01 und HLA-C\*16:01 jeweils zusammen) oder auch einzeln (z. B. nur HLA-C\*04:01) transfiziert. So konnte auf Kreuzreaktionen mit COS-7 eigenen Proteinen getestet werden, die über die patienteneigenen HLA-Moleküle präsentiert werden könnten.

Als Transfektionskontrolle wurden mit sGFP transfizierte COS-7 Zellen mitgeführt und als Kontrolle für die Aktivierbarkeit der T-Hybridome eine CD3-Aktivierung. Zum Ausschluss von übermäßiger Spontanaktivität wurden zudem T-Hybridome ohne jeglichen Zusatz betrachtet.

Am Tag nach der Transfektion (für den Screening-Zeitpunkt nach 48 h) und am zweiten Tag nach der Transfektion (für den Zeitpunkt nach 72h) wurde von den Schalen mit den transfizierten COS-7 Zellen das Medium abgesaugt. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen, um tote Zellen und nicht in die Zellen aufgenommene Plasmide nach Möglichkeit zu entfernen. Die COS-7 Zellen wurden erneut mit 1 ml Medium bedeckt und in den Mikroskopraum transportiert. Dieser kann nach Benutzung mit UV-Licht bestrahlt werden. Der Untersucher arbeitet darin mit Haube, Mundschutz, Handschuhen, Schuhüberziehern und Laborkittel. Die enthaltene PCR-Werkbank wird vor und nach jedem Gebrauch - ebenso wie das Mikroskop selbst - zusätzlich mit UV-Licht für 30 Minuten bestrahlt. Die Werkbank wird zudem nach Benutzung mit *DNaexitus Plus* (PanReac Applichem) und Ethanol gereinigt. All dies dient der Vermeidung von Kontaminationen.

In diesem Raum wurden pro Schale mit transfizierten COS-7 Zellen in der Regel  $1,0 \times 10^6$  T-Hybridomzellen in zwei Milliliter *RPMI Complete Medium* kreisend dazu gegeben, um eine annähernd gleichmäßige Dichte der Hybridome zu erreichen. Mit möglichst wenig Bewegung wurden die Platten in einen kleinen Inkubator direkt neben dem Mikroskop transferiert und dort für 16 Stunden inkubiert. Nach besagten 16 Stunden wurden die Platten unter dem Fluoreszenzmikroskop auf Cluster, also Gruppen aktivierter, sGFP-exprimierender T-Hybridome untersucht.

Derartige oben erwähnte Cluster mit einer Größe von größer oder gleich drei aktivierten Hybridomzellen in direkter Umgebung zeigen eine Aktivierung durch die darunter liegende COS-7 Zelle bzw. darunter liegenden COS-7 Zellen an. Diese COS-7 Zelle bzw. Zellen enthalten dann ein Plasmid, das für ein Peptid kodiert, welches durch den TZR der Hybridomzellen erkannt wird, und somit zur Aktivierung der Zellen und zur sGFP-Expression führt. (siehe 1.2.2)

War ein solches Cluster gefunden, wurde auf dem Cy3-Kanal, dem roten Fluoreszenzkanal, untersucht, ob es sich bei der Fluoreszenz nicht um Autofluoreszenz handelte. In diesem Fall wäre auch im Cy3-Kanal an dieser Stelle ein Signal zu sehen gewesen. Zudem wurde durch leichtes Rütteln am Mikroskop überprüft, dass die Hybridome fest an den antigenpräsentierenden Zellen sitzen. Nur dann war die Wahrscheinlichkeit hoch, durch Isolierung der unter dem Cluster liegenden APZ, die APZ mit dem aktivierenden Plasmid zu isolieren. Im Vergleich zur Negativkontrolle sollten sich in den Proben deutlich mehr aktivierte Zellen und Cluster finden.

Sodann wurden entsprechende COS-7 Zellen wie unter Punkt 2.3.9 beschrieben isoliert. Die enthaltenen Plasmide wurden per PCR vervielfältigt, via Gel analysiert, aufgereinigt, in den Expressionsvektor ligiert, präzipitiert und nach Transformation in *E. coli* und nach einer Mini-Prep für eine Retransfektion verwendet. (siehe 2.5.2.1 und 2.5.2.3 und 2.5.4.6-2.5.4.10)

### **2.3.7.2.2.2 Suche nach Reaktivierung und zweite Runde Isolierung**

Proben aus der Isolierung von APZ, die wie unter 2.5.4.6-2.5.4.10 verarbeitet sowie per Sequenzierung überprüft worden waren (siehe 2.5.5), wurden erneut zur Transfektion von COS-7 Zellen verwendet. Hierfür wurden 1 µg der neuen Probe mit 1 µg der zugehörigen HLA kodierenden Plasmide in COS-7 Zellen transfiziert wie bereits beschrieben und diese für eine erneute Kokultur mit T-Hybridomen genutzt. Auch hier wurde zum Zeitpunkt nach 48 Stunden und zum Zeitpunkt nach 72 Stunden nach Clustern aktivierter Zellen gesucht. Diese sollten aber infolge einer Anreicherung gegenüber der ersten Runde nun in höherer Frequenz auftreten. Darunterliegende aktivierende COS-7 Zellen wurden ebenso isoliert und weiterverarbeitet wie in der ersten Runde.

### **2.3.7.2.2.3 Suche nach Reaktivierung in gepoolten Proben**

Proben aus der zweiten Runde Isolierung, die ebenfalls wie in 2.5.4.6-2.5.4.10 beschrieben verarbeitet und kontrolliert (siehe 2.5.5) worden waren, konnten wiederum zur Transfektion von COS-7 Zellen und zur Kokultur mit T-Hybridomzellen verwendet werden. Das Ziel war, zu sehen, ob sich weiterhin eine Reaktivierung im Sinne von gehäuften Clustern finden ließe.

Hierfür wurden die Proben aus der zweiten Runde Isolierung nach dem ursprünglichen HLA-Typ entsprechend gepoolt transfiziert (z. B. Proben aus Transfektionen mit HLA-A\*02:01 und HLA-A\*23:01 zusammengefasst und analog für HLA-B\*35:01 und HLA-B\*44:03 oder HLA-C\*04:01 und HLA-C\*16:01 zusammen bzw. HLA-C\*04:01 zusätzlich separat). Derart wurden bis zu 5 Proben zusammengefasst und mit den entsprechenden HLA-Molekülen/dem entsprechenden HLA-Molekül transfiziert. Für Pools aus 5 Proben wurden je Probe 200 ng (1 µg Probe Gesamtmenge), analog bei 4 Proben je 250 ng transfiziert.

### **2.3.7.2.2.4 Kandidatenpeptide**

Durch Datenbankanalyse ermittelte K. Dornmair drei mögliche Kandidatenpeptide passend zu den Bindungsmotiven von zwei der bekannten HLA-Moleküle von IP2, nämlich HLA-C\*04:01 und HLA-A\*02:01.

Die Kandidaten wurden aus CSRP2 generiert, das wie in der Einleitung unter 1.1.4.1.1.1.1 geschildert nachgewiesenermaßen mit Antikörpern von IP2 reagiert hatte.

Die Aminosäuresequenzen und zugehörige HLA-Moleküle der Kandidatenpeptide sind im Folgenden dargestellt:

GYGQGAGTL (HLA-C\*04:01); GYGQGAGAL (HLA-C\*04:01); NLDSTTVAI (HLA-A\*02:01)

Die Kandidaten wurden von J. Malotka in den Vektor pcDNA™ 3.1 D/V5-His-TOPO® aus dem pcDNA™ 3.1 *Directional TOPO® Expression Kit* (Invitrogen) kloniert. Die Transfektion und Kokultur erfolgte wie unter 2.3.7.2.2.1 für die PECP-Bibliotheken dargestellt und die Auswertung erfolgte nach jeweils 16 Stunden in Kokultur. Allerdings wurden hier dieselben Platten mit transfizierten COS-7 Zellen sowohl für den 48h-Screeningzeitpunkt als auch für den Screeningzeitpunkt 72 Stunden nach Transfektion verwendet. Hierfür wurden nach Untersuchung der

Platten nach 48 Stunden die Hybridomzellen zunächst wieder abgesaugt. Dann wurden die darunter adhären liegenden COS-7 Zellen mehrmals mit Medium gewaschen, bevor wieder neue Hybridomzellen für die Überprüfung auf Aktivierung am nächsten Tag (Zeitpunkt 72 h nach Transfektion) zugegeben wurden.

### 2.3.8 Nachweismöglichkeiten der Aktivierung von T-Hybridomzellen

#### 2.3.8.1 IL-2 ELISA

Werden die T-Hybridome aktiviert, produzieren sie über den NFAT-Signalweg IL-2, das im Kulturüberstand nachgewiesen werden kann. Hierfür wurden Nunc-Immuno™ MaxiSorp™ 96-Well-Flachbodenplatten (ThermoFisher Scientific™) und das IL-2-ELISA Ready-SET-Go!® Kit (eBioscience) verwendet. Die Ausführung erfolgte wie in der Anleitung vorgegeben, allerdings wurde jeweils nur das halbe Volumen eingesetzt. Zu dem ELISA wurde ein Standard mitgeführt.

Die Auswertung der ELISA-Platten erfolgte auf dem ELISA-Reader Victor 2™ 1420 Multilabel counter mit dem Programm Wallac bei 450 nm mit der Möglichkeit der Subtraktion von 540 nm.

#### 2.3.8.2 Fluoreszenzmikroskopie mittels NFAT-sGFP

Bei Aktivierung produzieren die T-Hybridomzellen außerdem über den NFAT-Signalweg sGFP und können somit unter dem Fluoreszenzmikroskop als grün fluoreszierend wahrgenommen werden.

Dies wurde unter dem Mikroskop Axiovert 200 M (inverses Fluoreszenzmikroskop, Zeiss) analysiert. GFP wurde mit einem Bandbreitenfilter mit 472/30 nm Exzitation und 520/35 nm Emission mit dem BrightLine Fluorescence Filter von Semrock (Rochester, NY, USA) überprüft. Zum Ausschluss von Artefakten im Sinne einer Autofluoreszenz wurde auch der Cy3-Kanal (Bandbreitenfilter mit 545/25 nm Exzitation und 605/70 nm Emission (Zeiss)) betrachtet. Fand sich hier ebenfalls ein Signal an der gleichen Stelle, handelte es sich um Autofluoreszenz.

Aufnahmen wurden mit der MetaMorph Software 7.7.4.0 (Molecular Devices, Sunnyvale, USA) mit 600 ms bzw. 400 ms Belichtungszeit für den GFP bzw. Cy3-Kanal und 100 ms Belichtungszeit für den Durchlichtkanal gemacht und mit ImageJ 1.51h (Java 1.8.0\_66, 64 bit) (NIH, Bethesda, Maryland, USA) bearbeitet.

#### 2.3.8.3 Durchflusszytometrie mittels NFAT-sGFP

Genauso wie die aktivierten sGFP-exprimierenden Zellen unter dem Mikroskop wahrgenommen werden konnten, konnten sie ebenso in der Durchflusszytometrie erkannt werden, und somit der Prozentsatz aktivierter Zellen in einer Probe bestimmt werden.

Mehr zum Ablauf der Durchflusszytometrie unter 2.4.1.3.

### 2.3.9 Isolierung von antigenpräsentierenden Zellen mittels Mikromanipulator

Wenn bei der Kokultur von T-Hybridomzellen und COS-7 Zellen aktivierte sGFP-exprimierende Hybridomzellen in Clustern größer oder gleich drei aktivierter benachbarter T-Hybridome beobachtet wurden, wurden die darunter liegende COS-7 Zelle bzw. die darunterliegenden COS-7 Zellen isoliert. Voraussetzung hierfür war u. a., dass die T-Hybridomzellen relativ fest an ihrer Position waren, wie bereits zuvor ausgeführt. Die Isolierung erfolgte mithilfe eines Mikromanipulators (LN 25 Mini Unit, Luigs & Neumann, Ratingen, D) und Glaskapillaren mit 14 µm Innendurchmesser und abgeschrägter

Spitze (BioMedical Instruments, Zöllnitz, D), die in einem Mikroinjektor (CellTram® vario, Eppendorf) befestigt waren. Die isolierten Zellen wurden direkt im Anschluss in ein PCR-Gefäß mit 7 µl vorgelegtem gekühlten *DEPC-treated* H<sub>2</sub>O überführt. Die Isolierung wurde über den PC und eine CCD-Kamera mit Fotos vor und nach der Isolierung dokumentiert. Daraufhin folgten 5 min bei 80 °C in der PCR Maschine zur Inaktivierung von DNasen. Die isolierten Zellen wurden bis zur Einzelzell-PCR zur Plasmidamplifizierung auf Eis gelagert. (siehe 2.5.4.6)

### **2.3.10 Methoden zur Verringerung der Spontanaktivierung**

Im Rahmen dieser Dissertation kam es immer wieder vor, dass die T-Hybridomzellen von IP2 spontanaktiv waren und zu einem geringen Prozentsatz sGFP exprimierten.

Um die Rate spontanaktiver T-Hybridomzellen möglichst gering zu halten, wurden verschiedene Strategien angewandt. Die Zellen durften zum einen nicht zu dicht in Kultur gehalten werden, zum anderen wurde zweimal eine Reklonierung angesetzt. Darüber hinaus wurde versucht, die Ursachen dieser spontanen Aktivierung zusammen mit E. Beltran zu ergründen. (siehe 2.3.10.2)

#### **2.3.10.1 Reklonierung IP2 Klon 11**

Eine Reklonierung von IP2-8S1 Zellen wurde im Rahmen der Experimente für diese Dissertation zweimal angesetzt, um die Rate spontanaktiver Zellen möglichst gering zu halten.

Für die Reklonierung wurden zu einem Zeitpunkt 90 Zellen auf 60 ml Medium verdünnt und auf drei 96-Well-Platten à 200 µl pro Well verteilt, bevor die Platten für 7-8 Tage in Folie eingewickelt inkubiert wurden. Das Einwickeln in Folie sollte ein Verdampfen des Mediums im Inkubator auf ein Minimum reduzieren.

Die zweite Möglichkeit war es, mittels Durchflusszytometrie Einzelzellen auf 96-Well-Platten zu verteilen und wie oben erläutert weiter vorzugehen (in Kooperation mit E. Beltran, Arbeitsgruppe Dornmair, Institut für klinische Neuroimmunologie, Klinikum der Universität München).

Nach 7-8 Tagen wurde eine Auswahl der gewachsenen Klone in 24-Well-Platten überführt. Jeder Klon wurde durch Analyse mittels Durchflusszytometrie auf die Oberflächenexpression von CD3 und CD8 sowie CD3-Aktivierbarkeit und Spontanaktivierung getestet. Ebenso wurden die letzten beiden Punkte am Fluoreszenzmikroskop überprüft. Die besten Klone wurden ausgewählt und in mehreren Kryoröhrchen für spätere Versuche eingefroren.

#### **2.3.10.2 Untersuchungen zu autoaktivierten T-Hybridomen**

Um Gründe für die Spontanaktivierung der T-Hybridome zu finden, wurden spontanaktivierte, GFP<sup>+</sup> Zellen mit nicht aktivierten, GFP<sup>-</sup> Zellen verglichen. Das Ziel war es, Regulationspunkte zu finden, die ein Umgehen dieses Problems in Zukunft ermöglichen würden.

Hierfür wurden verschiedene Klone von IP2 Hybridomen zunächst getrennt nach GFP<sup>+</sup> und GFP<sup>-</sup> Zellen mittels Durchflusszytometrie aufgeteilt.

Die so isolierten Zellen wurden separat wieder in Kultur genommen und für eine Woche expandiert. Anschließend wurden sie unter dem Fluoreszenzmikroskop und erneut mittels Durchflusszytometrie analysiert. Von diesen Zellproben wurden die stark GFP-exprimierenden und sicher GFP<sup>-</sup> Zellen für die nächsten Schritte getrennt isoliert. (siehe 2.4.1.4) Ein Intermediärbereich wurde bei der Analyse ausgespart, um sicherzugehen, dass die Populationen somit komplett voneinander getrennt werden konnten und sich möglichst stark in der Expression unterschieden.

Die analysierten Zellen wurden von E. Beltran in Trizol überführt und eingefroren. Aus ihnen wurde im Verlauf die RNA der verschiedenen Populationen isoliert und weiter verarbeitet, bevor die Proben zum NGS gegeben wurden, um ihr Transkriptom miteinander zu vergleichen. (siehe 2.4.1.4, 2.5.1 und 2.5.4.5) Alle Experimente zu diesem Thema fanden in Kooperation mit E. Beltran statt.

## 2.4 Immunologische Methoden

### 2.4.1 Durchflusszytometrie

Das *fluorescence-activated cell sorting* oder *scanning* (kurz FACS) bzw. die Durchflusszytometrie beruht allgemein auf der Verwendung von Lasern, anhand deren Brechung an einzelnen Zellen Informationen über die Gestalt dieser Zellen erlangt werden können. (Jaroszeski and Radcliff, 1999) Diese Technik fand in der vorliegenden Dissertation in mehrfacher Hinsicht Anwendung.

Zur Unterscheidung verschiedener Zellen wurden hierbei zum einen die beiden Größen FSC und SSC (*forward angle light scatter* und *side angle light scatter*) verwendet, die sich auf die Streuung des Lichts durch das Zellvolumen bzw. die Granularität beziehen. (Jaroszeski and Radcliff, 1999)

Zum anderen konnten Zellen mit spezifischen Antikörpern gefärbt werden, die mit einem Fluorophor gekoppelt sind und somit ein definiertes Signal in der Durchflusszytometrie erzeugen. (siehe 2.4.1.2)

Darüber hinaus lassen sich GFP-exprimierende Zellen ebenfalls in der Durchflusszytometrie an ihrer Fluoreszenz erkennen. (siehe 2.4.1.3) Auch bestand die Möglichkeit, Zellen nach zuvor festgelegten Eigenschaften in verschiedene Populationen einzuteilen, und direkt in separate Gefäße aufzuteilen. (siehe 2.4.1.4)

#### 2.4.1.1 Allgemeiner Ablauf und Vorbereitung der Proben

Vor der Vorbereitung der Proben musste ein spezieller Durchflusszytometrie Puffer aus 1 % FCS in 1x PBS hergestellt werden. Die gewünschte Menge zu analysierender Zellen pro Probe wurde in einer 96-Well-Spitzbodenplatte bei 4 °C und 300 g für 5 Minuten zentrifugiert.

Der Überstand wurde verworfen und die Zellpellets mit 150 µl gekühltem Durchflusszytometrie Puffer resuspendiert und gewaschen, bevor sie erneut bei oben genannten Einstellungen für 5 Minuten zentrifugiert wurden. Der Waschschrift wurde dreimal wiederholt.

Für den Fall, dass die Proben mit Antikörpern gefärbt werden mussten, siehe unter 2.4.1.2.

Ansonsten wurden die Zellen nach dem letzten Waschschrift in 150 µl Durchflusszytometrie Puffer oder, falls eine Färbung von toten Zellen mithilfe von TO-PRO®-3 (in einer Verdünnung von 1:4000 bis 1:6000) oder PI (1:500) erfolgen sollte, mit diesen Farbstoffen resuspendiert.

Bei größeren, zur Aggregation neigenden Zellen, wurde die Zellsuspension filtriert. Die Analyse der akquirierten Durchflusszytometrie-Daten erfolgte mit der *FlowJo* Software V10 Vx0.7, *FlowJo* X 10.0.7r2 und einer Testversion von *FlowJo* 10.6.0.

#### 2.4.1.2 Färbungen

Für die Arbeit mit T-Hybridomzellen waren Durchflusszytometrie-Antikörper zur Färbung der Oberflächenmoleküle CD3 und CD8 essentiell. Eine Färbung hiermit ermöglichte zum einen die einfache Beurteilung der Expression in verschiedenen Zellklonen, zum anderen war durch eine

Färbung mit CD3-Antikörpern eine Unterscheidung der T-Hybridome von B-Zellen in der Kokultur mit LCL-Zellen durchführbar.

Für die entsprechenden Färbungen wurde nach den drei Waschschritten der jeweilige Antikörper in einer Verdünnung von 1:50 zur Resuspendierung der Zellpellets verwendet. Danach wurden die Proben auf Eis für etwa 30 Minuten unter Lichtschutz inkubiert, bevor sie erneut wie zuvor zentrifugiert und zusätzlich zweimal gewaschen wurden. Abschließend wurden sie ebenfalls entweder mit Durchflusszytometrie Puffer oder dem entsprechenden Totfarbstoff resuspendiert.

Wichtig war, eine Isotyp-Kontrolle zu jedem spezifischen Antikörper mitzuführen, denn nur so konnte ausgeschlossen werden, dass der Farbstoff nicht lediglich unspezifisch bindet. (Jaroszeski and Radcliff, 1999) Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Antikörper sind unter 2.1.6 aufgelistet.

### **2.4.1.3 Kontrolle der GFP-Expression**

Durch die CD3-Aktivierung exprimieren die T-Hybridomzellen sGFP über den NFAT-Signalweg, das auf dem FITC-Kanal gemessen werden konnte. Auch spontanaktivierte, sGFP-exprimierende Hybridome konnten so wahrgenommen und isoliert werden. (siehe 2.4.1.4)

Ebenso konnten anderen Zellen wie COS-7 und LCL-Zellen mit GFP-exprimierenden Vektoren transfiziert werden, deren Expression ebenfalls mittels Durchflusszytometrie kontrolliert und quantifiziert werden konnte.

### **2.4.1.4 Isolierung von verschiedenen Zellpopulationen mit BD FACSAria™ Fusion**

Für die Analyse von spontanaktiven T-Hybridomzellen wurden entsprechende Mengen der zu untersuchenden IP2-Klone in Durchflusszytometrie Puffer resuspendiert und mit PI tote Zellen angefärbt. Durch eine entsprechende Filterung wurde sichergestellt, dass die Zellen einzeln in Suspension vorliegen.

Unter Verwendung des Durchflusszytometers BD FACSAria™ Fusion wurden lebende sGFP-exprimierende (GFP<sup>+</sup>) von lebenden sGFP negativen (GFP<sup>-</sup>) Zellpopulationen unterschieden und in getrennte Gefäße mit Zellkulturmedium aufgeteilt. Zur Abgrenzung dieser beiden Populationen voneinander wurde zum Vergleich als Negativkontrolle eine Zelllinie ohne NFAT-sGFP (58-JM22-CD8) mitgeführt.

Diese Zellen wurden wieder für etwa eine Woche in Kultur genommen und dann erneut wie beschrieben aufgeteilt, sodass von den GFP<sup>+</sup> die weiterhin GFP<sup>+</sup> und von den zuvor GFP<sup>-</sup> die weiterhin GFP<sup>-</sup> Zellen weiterverwendet wurden. Von jeder Bedingung wurden 50 000 Zellen isoliert. Diese wurden anschließend in Trizol eingefroren. Aus den derart getrennt isolierten Zellpopulationen wurde die RNA isoliert und weiterverarbeitet. (siehe 2.3.10.2, 2.5.1, 2.5.4.1 und 2.5.4.5)

## **2.4.2 Immunhistochemie**

### **2.4.2.1 Färbung von CD94 und CD8α in Hirnschnitten**

Die Hirnschnitte aus der Biopsie des Patienten A, die von M. Konjevic in der Arbeitsgruppe Dornmair hergestellt worden waren, wurden für die weitere Untersuchung von CD94<sup>+</sup>-CD8α<sup>+</sup> und CD94<sup>-</sup>-CD8α<sup>+</sup> Zellen mit Antikörpern zur Markierung der Oberflächenmarker CD94 und CD8α gefärbt. Zuvor waren die Schnitte im Gefrierschrank bei -80 °C zwischengelagert und wurden auf Trockeneis transportiert.

Sowohl die Färbung als auch das Schneiden mittels LMD (Lasermikrodissektion, Palm MicroBeam Z, PALM Microlaser Technologies) fanden in einem Reinraum statt, der nach Benutzung ebenso wie die PCR-Werkbank mit *RNaseZap*<sup>TM</sup> (Sigma und Ambion<sup>TM</sup>, ThermoFisher Scientific<sup>TM</sup>), *DNA-ExitusPlus*<sup>TM</sup> und Ethanol (Roth) gereinigt wurde. Anschließend erfolgte eine Bestrahlung des Raumes und der PCR-Werkbank mit UV-Licht für jeweils mindestens 30 Minuten, um Kontaminationen zu verhindern.

Der Wissenschaftler trug zudem Laborkittel, Haube, Mundschutz, Handschuhe und Schuhüberzieher, v. a. um die Verbreitung von RNasen im Raum zu vermindern, die zu einer Degradierung der Proben führen könnten.

Zunächst wurden alle benötigten Reagenzien wie in Tabelle 14 aufgezeigt vorbereitet. Zu allen Mischungen wurde im letzten Schritt ein RNase Inhibitor (Roche) zugegeben.

**Tabelle 14: Zusammensetzung der Reagenzien für die immunhistochemische Färbung von CD94 und CD8 $\alpha$**  (Werte in  $\mu$ l)

Anwendung	Insgesamtes Volumen	2 % BSA	PBS	10 % BSA	RNase Inhibitor	Prim. Ak CD94 (1:50)	Sek. Ak CD94 (1:20)	Prim. Ak CD8 $\alpha$ (1:40)
Waschen	400		390		10			
Blocken	100			97,5	2,5			
Prim. Ak CD94	100	95,5			2,5	2		
Sek. Ak CD94 Alexa Fluor 488	100		92,5		2,5		5	
Prim. Ak CD8 $\alpha$ Cy3	100	95			2,5			2,5

Der Objektträger mit dem Hirnschnitt wurde für etwa 30 Sekunden in einem Vakuum-Exsikkator getrocknet, bis er weißlich war. Danach wurde er für zwei Minuten in kaltem Aceton fixiert. Nach Entfernung des Acetons folgte ein Waschschrift mit 100 bis 150  $\mu$ l PBS+RNase Inhibitor vor einem zweiminütigen Blockierungs-Schritt in 10 % BSA (Calbiochem®, Millipore). Dies diente dazu, unspezifische Bindung zu verringern. Der Deckel der befeuchteten Färbekammer sollte während der Inkubationsschritte möglichst geschlossen gehalten werden. Alle Schritte darin fanden auf einem vorgekühlten Block statt. Der 1:50 verdünnte, primäre Antikörper gegen CD94 wurde für fünf Minuten auf den Objektträger gegeben. (genauere Informationen zu den verwendeten Antikörpern unter 2.1.6) Eine gleichmäßige Verteilung des Antikörpers wurde durch regelmäßiges Schwenken des Objektträgers sichergestellt. Es schloss sich ein erneuter Waschschrift mit PBS+RNase Inhibitor an, gefolgt von der Inkubation mit dem sekundären Antikörper für CD94 (Ak Alexa Fluor 488 Ziege anti-Maus) in einer Verdünnung von 1:20 für zwei Minuten.

Der Objektträger mit der Probe wurde erneut gewaschen und dann wurde der Cy3 gelabelte CD8 $\alpha$  Antikörper in der Verdünnung 1:40 für zwei Minuten zugegeben. Nach einem letzten Waschschrift wurde eine Dehydratation in Ethanol mit steigendem Prozentgehalt von 75 %, 95 %, und zwei Mal 100 % für jeweils 30 Sekunden durchgeführt.

Der Objektträger wurde für die weiteren Experimente mit etwa 300  $\mu$ l Isopropanol (Sigma) bedeckt und in die entsprechende Halterung des Mikroskops für die Lasermikrodissektion gelegt. Das

Isopropanol schützte die Probe vor Austrocknung und RNasen Aktivität und wurde nach Bedarf oder nach etwa 10 bis 15 Minuten erneuert.

### 2.4.2.2 Isolierung von Zellen mittels Lasermikrodissektion

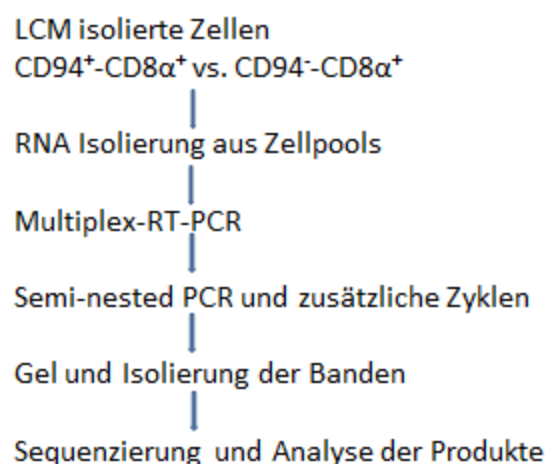
Über den PC und das angeschlossene Mikroskop wurden in dem Programm PalmRobo Software V 4.6 (Palm Microlaser Technologies) mit dem 20x und 40x Objektiv entsprechend gefärbte CD94<sup>+</sup>-CD8α<sup>+</sup> und CD94<sup>-</sup>-CD8α<sup>+</sup> Zellen gesucht und markiert. Dabei wurden Bilder auf den verschiedenen Kanälen aufgenommen: Durchlicht, DAPI, und für die entsprechenden Farbstoffe der Cy3-(CD8α) und FITC-Kanal (CD94).

Um die Zellen später darin aufzufangen, wurde ein Reaktionsgefäß mit adhäsiver Gelkappe (Adhesive caps, Zeiss) in den Halter des Palm *RoboMovers* eingespannt und über der Oberfläche des Objektträgers positioniert.

Die Funktionen des Lasers (Dicke und Genauigkeit des Schnitts, Laserenergie) wurden getestet und bei Bedarf nachkalibriert. Es wurde kontrolliert, ob die gewünschten Zellen weiterhin genau markiert waren und ob das Isopropanol auf der Probe abgetrocknet war. Dann wurden die markierten Bereiche nacheinander ausgeschnitten und die Zellen mittels Laser in die Gelkappe katapultiert. Abschließend konnte im 10x Objektiv kontrolliert werden, dass Zellen im Gel der Kappe sind.

Auf diese Art wurden zwei verschiedene Zellsorten in getrennte Reaktionsgefäße isoliert: zum einen CD94<sup>+</sup>-CD8α<sup>+</sup> Zellen und zum anderen CD94<sup>-</sup>-CD8α<sup>+</sup> Zellen. Der Heizblock wurde auf eine Temperatur von 42-44 °C gebracht und 10 µl *Extraction Buffer* (Applied Bioscience) wurden in den Deckel der Reaktionsgefäße gegeben. Diese wurden dann für 30 Minuten umgedreht im Heizblock inkubiert, bevor sie bei 16 600 g eine Minute zentrifugiert wurden und dann auf Trockeneis zur Weiterverarbeitung gelagert oder für die Aufbewahrung bei -80 °C in den Gefrierschrank transferiert wurden.

Die Weiterverarbeitung der Zellpools ist in Abbildung 8 zusammengefasst und wird in den jeweiligen Kapiteln genauer beschrieben.



**Abbildung 8: Übersicht über den Ablauf des Experiments mit LCM isolierten Zellen.** Aus den Zellpools der CD94<sup>+</sup>-CD8α<sup>+</sup> Zellen und CD94<sup>-</sup>-CD8α<sup>+</sup> Zellen wurde jeweils die RNA isoliert, bevor diese mittels (RT-) PCRs verarbeitet und schließlich analysiert wurde.



## 2.5 Molekularbiologische Methoden

### 2.5.1 RNA Isolierung

Die RNA Isolierung aus den mittels LMD-isolierten-Zellpools erfolgte nach Anleitung für das ARCTURUS® *PicoPure*® RNA Extraktions Kit (Applied Biosystems™, ThermoFisher Scientific™). Um die Reinheit der RNA-Probe zu erhöhen, wurde zusätzlich der Schritt der DNase-Behandlung in den Ablauf integriert.

Die RNA von mittels Durchflusszytometrie isolierten Zellen im Rahmen der Untersuchung von spontanaktiven T-Hybridomen (GFP<sup>+</sup> vs. GFP<sup>-</sup> Zellen) wurde zusammen mit E. Beltran unter Verwendung von *Trizol Reagent* extrahiert, nach den Angaben für das *PureLink*™ RNA Micro Kit (Invitrogen™, ThermoFisher Scientific™).

### 2.5.2 DNA Isolierung und Weiterverarbeitung

#### 2.5.2.1 Agarose-Gelelektrophorese

Für die Herstellung eines Gels für die Gelelektrophorese wurden eine entsprechende Menge Agarosepulver (Biozym) zu 1x TBE Puffer gegeben. Der Anteil der Agarose richtete sich nach der gewünschten Dichte des Gels. Normalerweise wurden zwischen 1,5 und 2 % Agarose verwendet, je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente.

Die Mischung wurde für 3-5 Minuten erhitzt bis das Agarosepulver vollständig gelöst war. *PeqGREEN* (peqlab) wurde als DNA-interkalierender, UV-absorbierender DNA Fluoreszenzfarbstoff nach Herstellerangaben zum Gel gegeben. Hierdurch konnten die Banden aus DNA-Fragmenten später auf einem UV- oder Blaulichttisch wahrgenommen werden. Die flüssige Agarose wurde in die Schlitten der Gelkammern mit eingesetzten Kämmen gegossen und abkühlen gelassen. Danach wurden vorsichtig die Kämmen herausgelöst und die Gele mit 1x TBE Puffer bedeckt.

Die PCR Probe und 6x DNA Auftragspuffer (z. B. 20µl und 4µl, 6:1) wurden gemischt und in die Taschen des Gels gegeben. Zudem wurden DNA-Leitern zum Längenabgleich aufgetragen, z. B. 50 bp (peqlab) und 1kbp (NEB) Leitern.

Aufgrund der negativen Phosphate läuft die DNA grundsätzlich unter angelegter Spannung in Richtung der Anode.

Die Elektrophorese wurde z. B. bei 90 Volt für 15 Minuten begonnen und anschließend für etwa 30 min bei 120 Volt fortgeführt, bis die DNA-Leitern ordentlich aufgetrennt waren. Zeit und Spannung veränderte sich je nach Gelgröße und -dichte.

Die Auswertung erfolgte dann unter UV-Licht bzw. auf einem Blaulichttisch. Die Gele wurden mittels Fotos dokumentiert und weiter zu analysierende Banden wurden isoliert.

#### 2.5.2.2 DNA Extraktion aus Agarose-Gelen

Für die DNA Extraktion aus Gelen wurden die zu untersuchenden Banden nach Durchführung der Gelelektrophorese auf dem Blaulichttisch mit einem Skalpell isoliert und die DNA dann mithilfe des *MinElute*™ *Gel Extraction Kit* (Qiagen) nach Herstellerangabe extrahiert. Die Elution erfolgte in 12 µl EB Puffer. Nach Messung der Konzentration (siehe 2.5.3) konnten die Proben zum Sequenzieren geschickt werden. (siehe 2.5.5)

### 2.5.2.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus E. coli

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus transformierten E. coli wurde das *QIAprep®Spin Miniprep Kit* (Qiagen) nach Anleitung verwendet. Zur Elution im letzten Schritt wurden statt der angegebenen 50 µl nur 32 µl EB (Qiagen) verwendet.

### 2.5.3 Bestimmung der DNA und RNA Konzentration via *NanoDrop™*

Zur Messung von DNA oder RNA Konzentrationen in Proben wurde das Vollspektrum-UV-Vis-Spektralphotometer *NanoDrop™ 2000 Spectrophotometer* (ThermoScientific™) verwendet. Etwa 1 bis 1,5 µl Probe wurden zur Messung bei 260 nm Wellenlänge entsprechend dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren verwendet und so die Konzentration in ng/µl ermittelt.

## 2.5.4 Weiterverarbeitung von RNA und DNA

### 2.5.4.1 RT - Reverse Transkription

Eine reverse Transkription wird verwendet, um isolierte RNA in cDNA umzuschreiben, die dann im Rahmen der folgenden PCR-Reaktionen (siehe 2.5.4.2) weiter vervielfältigt werden kann.

Die Methode wurde im Rahmen dieser Arbeit u. a. angewandt, um RNA aus Hirnschnitten von Patient A, Tonsillen RNA sowie die isolierte RNA der durch LMD isolierten CD94<sup>+</sup>-CD8α<sup>+</sup> und CD94<sup>-</sup>-CD8α<sup>+</sup> Zellpools weiterzuverarbeiten. Hierfür wurde die RT-Reaktion im Rahmen einer Multiplex-RT-PCR wie unter 2.5.4.3 weiter beschrieben durchgeführt.

Um bei den Untersuchungen zu Spontanaktivierung bei T-Hybridomen das Transkriptom der GFP<sup>+</sup> Zellen mit GFP<sup>-</sup> Zellen zu vergleichen, wurde ebenfalls nach RNA Isolierung mit Trizol aus den per Durchflusszytometrie isolierten Zellproben (siehe 2.4.1.4) eine RT durchgeführt. Dabei wurde entsprechend des „Full-length RNA-seq from single cells using Smart-seq2“ Protokolls vorgegangen. (Picelli et al., 2014)

Dementsprechend wurden 2 µl RNA mit 1 µl oligo-dT Primer (10 µM) und 1 µl dNTPs gemischt, herunterzentrifugiert (10 s bei 700 g, RT, wenn nicht anders erwähnt wurden auch in den weiteren Schritten diese Einstellungen verwendet) und für 3 min bei 72 °C inkubiert. Dann wurden die Proben wieder herunterzentrifugiert und auf Eis gestellt. Der Oligo-dT-Primer (Oligo-dT<sub>30</sub> VN, Sequenz siehe 2.1.4) konnte so an den Poly(A)-Schwanz der mRNA binden. Der Mastermix für die RT-Reaktion wurde wie folgt für die Anzahl der Proben + 1 angesetzt:

Mastermix:

SuperScript II reverse transcriptase	0,50 µl
RNase inhibitor (Roche)	0,25 µl
Superscript II first strand buffer 5x	2,00 µl
DTT (100 mM)	0,50 µl
Betaine (5 M)	2,00 µl
MgCl <sub>2</sub> (1 M) (ThermoScientific)	0,06 µl
TSO (100 µM)	0,10 µl
Nuklease freies Wasser	0,29 µl

Davon wurden 6 µl pro Probe mit dem Ansatz gemischt, herunterzentrifugiert und dann in die PCR-Maschine mit folgendem Programm gegeben:

42 °C	90 min	RT und <i>Template-Switching</i>
50 °C	2.0 min	
		X 10
42 °C	2.0 min	
70 °C	15 min	
4 °C	Pause	

Die RT lief wie im Protokoll vorgeschlagen mit den 10 zusätzlichen Zyklen zur Ausbeuteerhöhung ab. Der Schritt bei 70 °C diente der Enzyminaktivierung. (Picelli et al., 2014)

Auf die Produkte wurde im nächsten Schritt eine PCR-Amplifikation gesetzt. (siehe 2.5.4.5)

#### 2.5.4.2 PCR - Polymerase-Ketten-Reaktion

Eine PCR, also eine Polymerasen-Ketten-Reaktion, dient der Vervielfältigung von DNA-Abschnitten. Dies geschieht durch das Binden (das sogenannte *Annealen*) von kurzen Oligonukleotiden (sogenannten Primern) vor und hinter (entsprechend dem *forward* und *reverse* Primer) der zu vervielfältigenden Sequenz.

Die Sequenz zwischen den Primern wird dann durch Polymerasen mit Nukleotiden unter Verbrauch von ATP aufgefüllt.

Im Allgemeinen läuft eine PCR in folgenden Schritten ab:

- Aktivierung der Polymerase (im Falle von *Hot Start* Taqs) und Auflösung der Doppelstranghelix (95 °C)
- Primerhybridisierung (*Annealing*) an das *Template* (je nach Primer bei 55-67 °C, im Einzelfall zu berechnen)
- Elongation (72 °C)
- Wiederholung des Vorgangs bis zum Erreichen der gewünschten Zyklenanzahl

Bei allen PCRs dieser Dissertation wurden Negativkontrollen mitgeführt, in die statt der Probe H<sub>2</sub>O zugegeben wurde. Alle Primer wurden in kleine Aliquots aufgeteilt und nur wenige Male benutzt, um Kontaminationen vorzubeugen.

Die verschiedenen PCRs werden in den nachfolgenden Abschnitten genauer beschrieben.

#### 2.5.4.3 Multiplex-RT-PCR

Für die RNA der oben erwähnten Zellpools der CD94<sup>+</sup>-CD8α<sup>+</sup> und CD94<sup>-</sup>-CD8α<sup>+</sup> Zellen aus der Lasermikrodissektion und für aus Hirnschnitten und Tonsillen isolierte RNA fand die RT-Reaktion direkt im Rahmen einer Multiplex-RT-PCR statt. Das bedeutet, dass der hierfür verwendete Primer-Mix aus zunächst 11, später 12, einzelnen Primerpaaren (designt von K. Held und M. Konjevic) bestand. Somit können 11 bzw. 12 Transkripte von Interesse gleichzeitig analysiert werden. (siehe Tabelle 15)

**Tabelle 15: Im Rahmen der Multiplex-RT-PCR untersuchte Transkripte**

Nr.	Transkript		
1	NKG2A	7	CD94
2	NKG2C	8	Infy
3	NKG2D	9	CD3d
4	NKG2E	10	IL-10
5	NKG2F	11	HLA-E
6	NKG2H	12	β-Aktin

Die Aufstockung auf 12 Primer ergab sich durch die Erweiterung des Panels mit einem Primer für das Transkript eines konstitutiv exprimierten Gens, β-Aktin, das sich in durchflusszytometrischen Analysen von T-Zellen von E. Beltran bewährt hatte. (persönliche Kommunikation mit E. Beltran und M. Konjevic)

Eine Liste der verwendeten Primer und entsprechender Primer-Sequenzen ist unter 2.1.4 zu finden.

Für die Tonsillen RNA wurde ein Test mit *Q-Solution* (von Qiagen für anspruchsvolle *Templates* empfohlen) und einer ohne *Q-Solution* durchgeführt. Weiterführende Experimente für die RNA aus Hirnschnitten und Zellpool-RNA wurden dann nur noch mit dem Ansatz ohne *Q-Solution* absolviert.

Bei der RT-PCR für die LMD-isolierten-Zellpools wurden je 9 µl isolierte RNA eingesetzt und dementsprechend weniger H<sub>2</sub>O hinzugefügt. Die Zusammensetzung der beiden Ansätze ist nachfolgend aufgeführt:

Ohne Q-Solution

H <sub>2</sub> O	10,4 µl
5× OneStep RT-PCR Buffer	4,0 µl
Primer-Mix (1 µM)	2,0 µl
dNTP Mix	0,8 µl
OneStep RT-PCR Enzyme Mix	0,8 µl
RNase OUT (Invitrogen)	1,0 µl
RNA/ H <sub>2</sub> O	1,0 µl
Insgesamt	20 µl/PCR-Gefäß

Mit Q-Solution

H <sub>2</sub> O	6,4 µl
5x Q-Solution	4,0 µl
5× OneStep RT-PCR Buffer	4,0 µl
Primer-Mix (1 µM)	2,0 µl
dNTP Mix	0,8 µl
OneStep RT-PCR Enzyme Mix	0,8 µl
RNase OUT	1,0 µl
RNA / H <sub>2</sub> O	1,0 µl
Insgesamt	20 µl/PCR-Gefäß

Die Ansätze wurden für die entsprechende Anzahl an Proben und Negativkontrollen angesetzt.

Die Reaktion lief über folgendes PCR Programm in der PCR Maschine *Mastercycler®Pro vapo.protect™* (Eppendorf):

RT-PCR

50 °C	30 min	
95 °C	15 min	
94 °C	0.5 min	
55-57 °C	1.0 min	X20-28
72 °C	1.0 min	
72 °C	10 min	

Die Zyklenzahl und Temperatur des *Annealing* Schrittes wurden in einzelnen Fällen variiert, um eine verbesserte Primerbindung und Erhöhung der Produktausbeute zu ermöglichen. Die Zyklenanzahl lag allgemein bei 20-28 Zyklen, die *Annealing* Temperatur zwischen 55 und 57 °C.

Eine genaue Übersicht über das Experiment und die jeweilige Temperatur und Zyklenanzahl für die Multiplex-RT-PCR ist in Tabelle x1 im Anhang dargestellt. Auf die RT-PCR folgten eine *semi-nested* PCR und u. U. eine Addition von zusätzlichen Zyklen wie unter 2.5.4.4 beschrieben.

**2.5.4.4 Semi-nested PCR und zusätzliche Zyklen**

Auf die oben beschriebene Multiplex-RT-PCR wurde mit jeweils einem weiter innen gelegenen Primer pro Primerpaar eine *semi-nested* PCR durchgeführt. D. h. entweder der *forward* oder der *reverse* Primer wurde durch einen weiter innen auf dem *Template* bindenden Primer ersetzt. Der zweite Primer wurde nicht verändert.

In dieser PCR wurde jedes Primerpaar (siehe Tabelle 15) separat betrachtet. Der folgende Ansatz wurde also für 11 bzw. 12 Primerpaare je Probe angesetzt:

Semi-nested PCR

H <sub>2</sub> O	14,1 µl
10× PCR Buffer	2,0 µl
Primer (5 µM je for und rev)	je 1,2 µl
dNTP Mix	0,4 µl
HotStarTaq	0,1 µl
DNA/H <sub>2</sub> O	1,0 µl
Insgesamt	20 µl/PCR-Gefäß

Für die Analyse der LMD-isolierten-Zellpools wurde die DNA aus der Multiplex-RT-PCR einmal 1:3 verdünnt weiterverwendet und ein anderes Mal unverdünnt eingesetzt.

Das Programm für diese PCR sah wie folgt aus:

95 °C	5.0 min	
94 °C	0.5 min	
55-57 °C	1.0 min	X30-45
72 °C	1.0 min	
72 °C	10 min	
10 °C	Pause	

Die Zyklenanzahl und *Annealing* Temperatur wurde wie auch bei der Multiplex-RT-PCR in einzelnen Experimenten bei Bedarf noch variiert, um eine verbesserte Primerbindung zu ermöglichen und die Produktausbeute zu optimieren. Die Temperatur lag zwischen 55 und 57 °C und die Zyklenanzahl

zwischen 30 und 45. Hierzu finden sich mehr Informationen in Tabelle x2 im Anhang. Für CD3d wurde im Verlauf standardmäßig eine *nested* PCR nach bzw. statt der *semi-nested* PCR durchgeführt.

Z. T. wurde im Anschluss an die *semi-nested* PCR mit den gleichen Primern noch zusätzliche Zyklen hinzugefügt. Das bedeutet, auf das PCR Produkt (1 oder 2 µl) der oben beschriebenen *semi-nested* PCR wurde mit dem gleichen Ansatz und dem gleichen Programm noch einmal bis zu 45 Zyklen aufgesetzt, um mehr Produkt zu erhalten. Zusätzliche Zyklen wurden derart bei untersuchten Transkripten hinzugefügt, bei denen zunächst keine oder sehr schwache Banden gesehen wurden.

Bei der Primervalidierung an Tonsillen RNA war das bei NKG2C, NKG2E, NKG2H und CD94 der Fall. Für drei Subtypen (NKG2C, NKG2E und NKG2H) wurde die *Annealing* Temperatur in diesem Rahmen auf 55 °C gesenkt und für die *semi-nested* PCR und eventuell nötige zusätzliche Zyklen auch in allen späteren Experimenten so beibehalten. Derart liefen hier zusätzliche 25 Zyklen ab, indem 2 µl der *semi-nested* PCR als *Template* weiterverwendet wurden.

Bei der ersten Probe RNA aus dem Hirngebiet 10A von Patient A wurden bei zuvor schwacher oder nicht vorhandener Bande für NKG2C, NKG2D und NKG2H noch 20 Zyklen mehr bei 55 °C hinzugefügt, um eine höhere Produktausbeute zu erhalten. Für CD3d wurde hier anschließend noch eine *nested* PCR bei 57 °C durchgeführt, mit einer insgesamt erreichten Zyklenanzahl von über 100 Zyklen. Dieser Ablauf blieb für alle weiteren Experimente so erhalten.

Bei der zweiten Anwendung an Hirngewebe von Patient A wurden die Proben 10A-2 und 12b analysiert. Für CD3d wurde statt einer *semi-nested* PCR direkt anschließend an die Multiplex-RT-PCR eine *nested* PCR verwendet. Für alle noch fehlenden Banden wurden 35 zusätzliche Zyklen bei 55 bzw. 57 °C entsprechend durchgeführt. (siehe Tabelle x1 im Anhang)

Bei den LMD-isolierten-Zellpools (siehe 3.1.3.3.1) wurden zwei verschiedene Ansätze (Ansatz A und Ansatz B) für die *semi-nested* PCR verfolgt.

Für den ersten Ansatz (Ansatz A) wurde die RT-PCR 1:3 verdünnt in der *semi-nested* PCR für die einzelnen Primerpaare eingesetzt. Hier wurden 35 Zyklen bei 57 °C gewählt, bei den Ansätzen für NKG2C, NKG2E und NKG2H wurde mit der *Annealing* Temperatur von 55 °C gearbeitet. Darauf wurden für alle Produkte noch mehr Zyklen gesetzt, mit 60 statt sonst 20 µl Ansatz und mit 2 µl der vorherigen *semi-nested* PCR als *Template*. Das normale Programm wurde leicht abgewandelt ausgeführt, indem nach 20 und 25 Zyklen jeweils 10 µl des Volumens herausgenommen wurden, bevor noch je 5 weitere Zyklen abliefen. Für das Endvolumen von 40 µl betrug die Gesamtzyklenzahl dann 93 Zyklen (28 (Multiplex-RT-PCR)+35 (*semi-nested* PCR)+30 Zyklen).

In der zweiten Durchführung (Ansatz B) wurde 1 µl der RT unverdünnt für die *semi-nested* eingesetzt. Diese lief nun mit 45 Zyklen ab. Die folgenden zusätzlichen 45 Zyklen wurden mit exakt dem gleichen Ansatz wie die *semi-nested* PCR auf diese angesetzt. Somit lag die Gesamtzyklenzahl bei 118 Zyklen und damit so hoch, dass zu erwarten gewesen wäre, dass enthaltene Produkte sichtbare Banden bilden würden.

Nach dem Erreichen der gewünschten Zyklenanzahl wurden die PCRs über Agarosegele ausgewertet und entsprechende Banden geschnitten und sequenziert.

#### 2.5.4.5 Probenvorbereitung für *next generation sequencing*

Nach der initialen RT-Reaktion (siehe 2.5.4.1) folgte für die Untersuchungen zu Spontanaktivierung bei T-Hybridomen entsprechend des „Full length RNA-seq from single cells using smart-seq 2“ Protokolls (Picelli et al., 2014) ein Schritt zur PCR-Amplifikation. Auch im Weiteren wurde im Allgemeinen entsprechend des genannten Artikels vorgegangen.

Für die PCR-Amplifikation wurde ein PCR-Mix wie folgt für die entsprechende Anzahl an Proben + 1 angesetzt:

10 µl aus dem ersten Schritt der Reaktion

Plus:

Kapa HiFi HotStart ReadyMix (2x)	12,5 µl
IS/TSO PCR Primer (10 µM)	0,25 µl
Nuklease-freies Wasser	2,25 µl
Insgesamt je	25,0 µl

Die 15 µl PCR-Mix wurden mit den 10 µl aus der ersten Reaktion gemischt und dann wie unter 2.5.4.1 beschrieben zentrifugiert.

Das Programm für die PCR im *Mastercycler®Pro vapo.protect™* (Eppendorf) war folgendes:

98 °C	3.0 min	
98 °C	20 sec	
67 °C	15 sec	X18
72 °C	6.0 min	
72 °C	5.0 min	
4 °C	Pause	

Im Anschluss wurde die PCR aufgereinigt. Dies wurde in Zusammenarbeit mit Isabel Bauer (Arbeitsgruppe Kawakami, Institut für klinische Neuroimmunologie, Klinikum der Universität München) durchgeführt.

Hierfür wurden raumtemperierte *Agencourt®Ampure® XP Beads* (Beckman Coulter) verwendet und diese im Verhältnis 0,6:1 mit jeder Probe gemischt, bis die Lösung homogen war.

Die Mischung wurde 10 min bei RT inkubiert. In dieser Zeit band die DNA an die *Beads*.

Die Probengefäße wurden im nächsten Schritt für 5 Minuten auf einen magnetischen Halter gestellt. Die *Beads* sammelten sich so an einer Stelle und der Überstand konnte mit einer Pipette abgesaugt werden ohne die *Beads* zu berühren. Die *Beads* wurden mit 80 % Ethanol gewaschen und für 30 Sekunden darin inkubiert, bevor der Ethanol entfernt wurde. Der Ethanol-Schritt wurde noch einmal wiederholt.

Die *Beads* wurden trocknen gelassen, ehe die *Beads* mit EB-Puffer (10 µl) resuspendiert und 2 min außerhalb der Magnetplatte inkubiert wurden.

Als nächstes kamen die Proben wieder auf die Magnetplatte, bis sich die *Beads* an einer Stelle gesammelt hatten (etwa 2 min). Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Gefäß überführt. Die Konzentration der Proben wurde von Julia Hansen (Arbeitsgruppe Dornmair, Institut

## Material und Methoden

für klinische Neuroimmunologie, Klinikum der Universität München) in unserem Labor mittels Qubit™ (Qubit™ 3 Fluorometer, Invitrogen, ThermoFisher Scientific™) ermittelt, sowie die Größenverteilung der cDNA überprüft (2100 Bioanalyzer, Agilent, Santa Clara, Kalifornien, USA).

Darauf folgte die Durchführung der *Tagmentation* Reaktion und Amplifikation der Fragmente vor einer erneuten Aufreinigung und Qualitätskontrolle der Proben. Die Proben wurden abschließend gepoolt zum Sequenzieren gegeben.

*Tagmentation* bedeutet hier, dass die DNA in Fragmente zerlegt und gleichzeitig mit Adaptern für nachfolgende Reaktionen versehen wurde. Dieser Schritt wurde von der Tn5 Transposase ausgeführt. (Adey et al., 2010; Picelli et al., 2014) Es wurde das Nextera XT *DNA sample preparation kit* (Illumina) verwendet.

Die *Tagmentation*-Reaktion wurde hierzu wie folgt auf Eis zusammengemixt:

Tagment DNA buffer (2x)	10 µl
Amplicon tagment mix	5 µl
DNA aus PCR	entsprechend 0,8 ng Probe
Nuklease-freies Wasser	auffüllen auf 20 µl
Gesamtvolumen je	20 µl

Die *Tagmentation* Reaktion erfolgte bei 55 °C für 5 min.

Danach wurde die Tn5 Transposase wieder entfernt. Hierfür wurden 5 µl NT Puffer mit den 20 µl gemischt und für 5 Minuten bei RT inkubiert. Es folgte nun noch eine weitere PCR zur Vervielfältigung der mit Adaptern versehenen Fragmente.

Für den Mix wurden die 25 µl Probe mit folgenden Reagenzien gemischt:

Nextera PCR master mix	15 µl
Index 1 Primer (N7xx)	5 µl
Index 2 Primer (N5xx)	5 µl
Gesamtvolumen je	50 µl

Die Index Primer wurden so gewählt, dass jede Probe durch eine jeweils einzigartige Index-Primerkombination an den Enden (5', 3') eindeutig zu identifizieren war.

Das Programm für den *Mastercycler®Pro vapo.protect™* (Eppendorf) war folgendes:

72 °C	3.0 min	
95 °C	0.5 min	
95 °C	10 sec	
55 °C	0.5 min	X8
72 °C	0.5 min	
72 °C	5.0 min	
4 °C	Pause	

Nach einem weiteren PCR Aufreinigungsschritt (wie oben beschrieben, aber *Beads* zu Probe im Verhältnis 0,75:1) wurden die Proben für die Sequenzierung vorbereitet, d. h. die Konzentration und Größenverteilung wurden erneut wie bereits beschrieben von Julia Hansen überprüft. Dann wurden die verschiedenen Proben äquimolar gepoolt und zum *Next Generation Sequencing* an das *Gene Center* in Großhadern gegeben, wo sie mittels HiSeq1500 (Illumina) analysiert wurden.



Die entsprechende Auswertung in Bezug auf Unterschiede im Transkriptom der GFP<sup>+</sup> vs. GFP<sup>-</sup> Zellen erfolgte durch E. Beltran. (siehe 2.5.6 und 3.2.1.2.2)

#### 2.5.4.6 Einzelzell-PCR zur Vervielfältigung der PECP-Kopien aus isolierten APZ

Auf die per Mikromanipulator und Glaskapillare isolierten Einzelzellen (COS-7 Zellen) in 7 µl H<sub>2</sub>O (siehe 2.3.9), wurde im nächsten Schritt eine PCR gesetzt. Somit sollten die in der Zelle enthaltenen PECP-Kopien vervielfältigt werden und anschließend wieder in einen Expressionsvektor hineinkloniert (2.5.4.9) werden können, um sie für eine erneute Transfektionsrunde verwenden zu können. (siehe 2.5.4.8)

Die Mischung für die PCR war folgende:

2x Iproof™ HF Master Mix (Bio-Rad)	50 µl
DEPC H <sub>2</sub> O (Invitrogen)	42 µl
for Primer	0,5 µl
rev Primer	0,5 µl
Gesamt mit 7 µl vorgelegtem H <sub>2</sub> O je	100 µl

Als *forward* Primer dienten pcDNA- 2nd forTOPO bzw. pcDNA- For 1 und als *reverse* Primer pcDNA- Rev 3 bzw. pcDNA- Rev 1. Mehr hierzu unter 2.5.4.7.

Das Programm in der PCR-Maschine *Bioer Gene Touch Thermal Cycler* (Biozym) lief wie folgt ab:

98 °C	3.0 min	
98 °C	20 sec	
56 °C	20 sec	X40
72 °C	0.5 min	
72 °C	10 min	
4 °C	Pause	

Nach abgeschlossener PCR wurden die Proben bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C eingefroren. Zur Analyse wurden die Proben auf ein Gel aufgetragen. So wurde ausgewertet, welche PCR Produkte für Retransfektionen weiterverarbeitet werden sollten.

#### 2.5.4.7 Nested PCR

Die Einzelzell-PCR wurde teils mit dem Primerpaar pcDNA- 2nd forTOPO/pcDNA- Rev 3 angesetzt und nach Kontrolle der Banden durch Gelelektrophorese direkt weiterverwendet. (siehe 2.5.4.8-2.5.4.10)

In einer zweiten Versuchsreihe wurde stattdessen die Einzelzell-PCR mit den Primern pcDNA- For 1/ pcDNA- Rev 1 angesetzt, die weiter außen als pcDNA- 2nd forTOPO/pcDNA- Rev 3 auf dem zu vervielfältigenden Plasmid banden. Danach wurde dann eine *nested* PCR mit pcDNA- 2nd forTOPO und pcDNA- Rev 3 durchgeführt.

Die Durchführung der *nested* PCR diente der Erhöhung der Sensitivität, um auch eine sehr geringe Anzahl von PECP-Kopien in der isolierten Zelle nachweisen und vervielfältigen zu können.

Von der ersten Einzelzell-PCR mit pcDNA- For 1/ pcDNA- Rev 1 wurde hierfür ein Gel angefertigt und anhand der Bandenstärke die einzusetzende Menge für die *nested* PCR abgeschätzt. Die eingesetzte Menge an *Template* für die *nested* PCR lag zwischen 1 µl der unverdünnten Einzelzell-PCR bis zu 1 µl einer 1:100-Verdünnung.

Bei der zweiten Runde Isolierung - das bedeutet, die verarbeiteten und erneut in den Expressionsvektor klonierten PECP-Kopien aus isolierten APZ wurden in COS-7 Zellen retransfiziert, erneut für eine Kokultur eingesetzt und aus dieser Kokultur erneut aktivierende APZ isoliert - wurde die *nested* PCR z. T. mit dem Primer pcDNA- Rev 2 angesetzt. Der Primer pcDNA- Rev 3 konnte mehrfach auf dem retransfizierten Plasmid binden, was zu Problemen und Artefakten bei der PCR führte.

Das Volumen der *nested* PCRs betrug 50 µl. Ansonsten entsprachen der Ablauf und die Mischung der Einzelzell-PCR. (siehe 2.5.4.6)

Nach Durchführung dieser *nested* PCR wurden die Proben erneut auf ein Gel aufgetragen und ausgewertet, welche für Retransfektionen weiterverarbeitet werden sollten. Für den weiteren Ablauf siehe 2.5.4.8.

### 2.5.4.8 Verarbeitung von Proben zur Retransfektion

Wenn eine Probe erneut transfiziert werden sollte, um zu sehen ob es zu einer Reaktivierung kommen würde (siehe 2.3.7.2.2.2), wurde die Probe aufgereinigt und in den pcDNA™ 3.1 D/V5-His-TOPO® Vektor (*pcDNA™ 3.1 Directional TOPO® Expression Kit*) ligiert. (siehe 2.5.4.9) Dieses Plasmidkonstrukt wurde nach Präzipitation (siehe 2.5.4.10) in *ElectroMAX™ DH10B™ T1* E. coli transformiert und so amplifiziert. Davon wurde eine Mini-Prep durchgeführt und nach Kontrolle der Plasmidsequenzen (siehe 2.5.5) wurden damit wieder COS-7 Zellen für eine Kokultur mit T-Hybridomen retransfiziert, wie zu Beginn mit der PECP-Bibliothek. (siehe 2.3.7.2.2.1)

Aus der Kokultur wurden erneut aktivierende APZ isoliert und wie beschrieben mit ihnen verfahren (= zweite Runde Isolierung). Proben aus der zweiten Runde der Isolierung wurden in Form von Pools zur Retransfektion und Suche nach Reaktivierung verwendet. (siehe 2.3.7.2.2.3 und 3.2.2.3.1.3)

### 2.5.4.9 PCR Aufreinigung und TOPO-Ligation

Die PCR Aufreinigung für die Antigensuche mit PECP-Bibliotheken erfolgte mit dem *QIAquick® PCR Purification Kit* (Qiagen), die Elution erfolgte in 32 µl Elutionspuffer. Die PCR Aufreinigung im Rahmen des „Full length RNA-seq from single cells using smart-seq 2“ Protokolls (Picelli et al., 2014) wird unter 2.5.4.5 mitbeschrieben.

Mithilfe des pcDNA™ 3.1 *Directional TOPO® Expression Vector Kits* (Invitrogen) wurden die durch PCR vervielfältigten PECP-Kopien aus den isolierten APZ wieder in den Vektor kloniert. Es handelt sich dabei um eine direktionale TOPO-Klonierung. Durch die PCR hatten die PCR Produkte am 5'-Ende die Sequenz CACC, die komplementär zum Ende des Vektors ist, und somit die Bindung ermöglichte.

Für die TOPO-Ligation wurde das aufgereinigte PCR Produkt auf 1 ng/µl verdünnt. Es wurden 3,5 µl DEPC H<sub>2</sub>O (Invitrogen) mit 1 µl Salzlösung (Invitrogen), 1 µl verdünntem PCR Produkt und 0,5 µl pcDNA™3.1 D/V5-His-TOPO® Vektor gemischt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Danach wurde das Gemisch bei 16 °C über Nacht inkubiert, dann präzipitiert und durch Elektroporation wieder in E. coli transformiert.

### 2.5.4.10 DNA Präzipitation

Für die DNA Präzipitation wurden folgende Reagenzien zum Ligationsgemisch (2.5.4.9) gegeben:

Glycogen (20 mg/ml, Roche)	1 µl
Pellet Paint® Co-Precipitant (Merck)	2 µl
Natriumacetat (3 M Natriumacetat Ph 5.2, Merck)	1 µl
Ethanol (Sigma, 100 %)	25 µl

Die Mischung wurde mindestens 30 Minuten bei -80 °C inkubiert, dann für 30 bis 60 Minuten bei 4 °C und 14000 rpm zentrifugiert, bevor der Überstand verworfen wurde und zwei Mal mit 200 µl 70 % Ethanol für 5 Minuten bei 4 °C und 14000 rpm gewaschen wurde.

Das Pellet wurde unter einer sauberen Hood lufttrocknen gelassen und dann in 2 µl EB-Puffer oder H<sub>2</sub>O gelöst. Das präzipitierte Ligat wurde für die Transformation von E. coli verwendet.

### 2.5.5 Sequenzierung und Sequenzanalyse

Zur Sequenzierung einer Probe wurden nach einer Gelextraktion 7 µl bestehend aus etwa 40 ng Proben-DNA und 1 µl des entsprechenden Primers in einer Verdünnung von 1:30 (entsprechend 3,3 µM) sowie H<sub>2</sub>O zum Sequenzieren beim *Sequencing Service*, LMU Biozentrum, Großhaderner Str. 2-4, 82152 Martinsried abgegeben. Standardmäßig wurde das Protokoll „Cycle, Clean & Run, BigDye V3.1“ gewählt.

Je nach Länge der zu sequenzierenden Probe wurde die eingesetzte Probenmenge wie folgt variiert:

100-200 bp: 5-20 ng

200-500 bp: 10-40 ng

Plasmide: 150-300 ng

Die resultierenden Sequenzen wurden mithilfe der Chromas 2.6.2 Software (Technelysium Pty Ltd., South Brisbane, AU) und *Nucleotide BLAST* analysiert. ([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE\\_TYPE=BlastSearch](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch))

Nicht automatisch erkannte, aber lesbare Nukleotide wurden manuell eingegeben, bevor die resultierende Sequenz zur Suche bei *Nucleotide BLAST* verwendet wurde.

Aus *Nucleotide BLAST* konnte die Übereinstimmung der erhaltenen Sequenz mit verschiedenen Genprodukten abgelesen werden. (Altschul et al., 1990) Darüber hinaus erfolgte bei einigen Proben eine Analyse mittels *T-Coffee*. (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/tcoffee/>, <http://tcoffee.crg.cat/>) (Di Tommaso et al., 2011; Notredame et al., 2000)

### 2.5.6 NGS Datenanalyse

Die NGS Analyse sowohl der Daten aus dem Projekt zu spontanaktivierten T-Hybridomen als auch zu den CD94<sup>+</sup> Zellen bei MS wurden von E. Beltran in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt. (siehe 3.2.1.2.2/3.1.3.3.2)

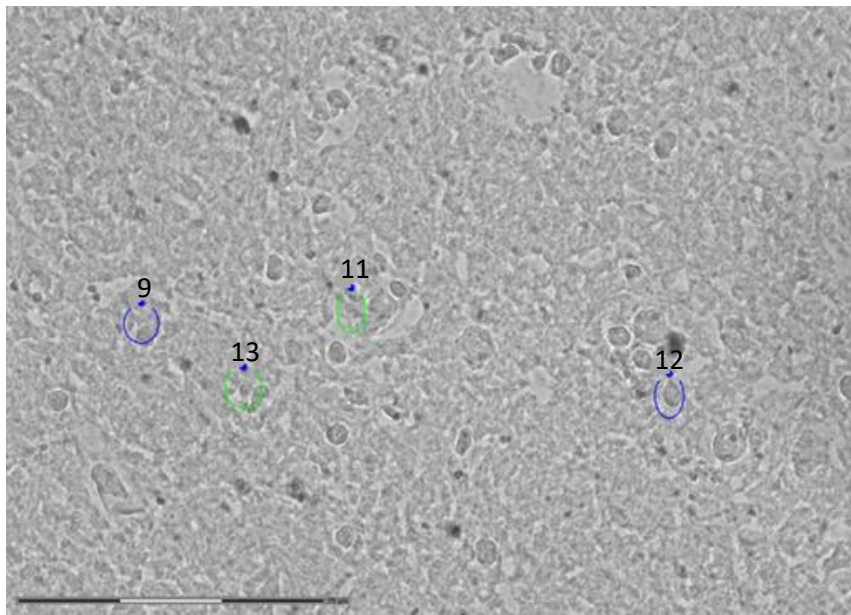
### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Charakterisierung von T-Zell-Populationen in Hirnbiopsien

Wie unter 2.1.9.1 und 1.1.4.1.2.2 geschildert stand von Patient A Hirnbiopsiematerial in Form von durch M. Konjevic angefertigten Hirnschnitten bereit. In Vorversuchen war M. Konjevic und K. Held eine T-Zell-Population aufgefallen, die  $CD94^+$ - $CD8\alpha^+$  war und in dieser Arbeit mit Hinsicht auf ihre Rolle in der Erkrankung weiter untersucht werden sollte.

##### 3.1.1 Färbung von CD94 und CD8 $\alpha$

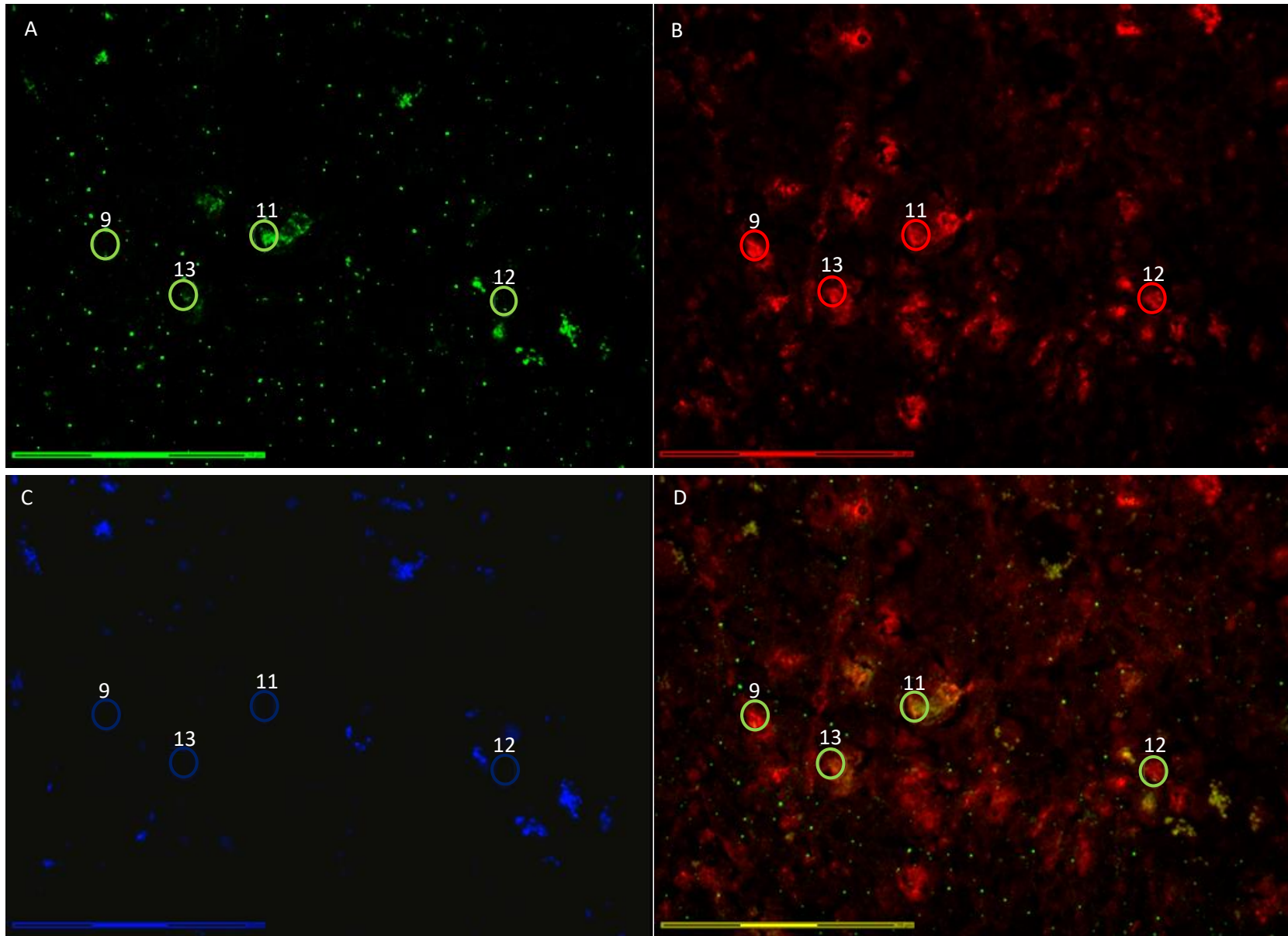
Es wurden in Kooperation mit M. Konjevic Schnitte mit einer Dicke von etwa 10  $\mu\text{m}$  aus dem Gebiet 10A von Patient A mit Antikörpern für CD94 und CD8 $\alpha$  immunhistochemisch gefärbt. (siehe 2.4.2.1) In Abbildung 9 ist der Durchlichtkanal dargestellt, mit dessen Hilfe gut die Fokussierung und die Lage der Zellen innerhalb der gesetzten Markierungen kontrolliert und vor Durchführung der LMD in dieser Ansicht angepasst werden konnten. Die markierten Zellen wurden entsprechend isoliert. (siehe 3.1.2)



**Abbildung 9: Darstellung des Durchlichtkanals.** Vier Zellen sind exemplarisch markiert. Die Markierungen können in dieser Ansicht angepasst werden, bevor die Zellen isoliert werden. Maßstabsbalken 75  $\mu\text{m}$ .

In Abbildung 10 sind die einzelnen Färbungen und Kanäle mit exemplarisch markierten Zellen zu sehen, sowie eine Überlagerung von CD8 $\alpha$  und CD94. Die Anwendung des DAPI Kanals (siehe Abbildung 10C) diente dabei der Abgrenzung echter Signale von Autofluoreszenz. Es fanden sich in den Hirnschnitten sowohl  $CD94^+$ - $CD8\alpha^+$  Zellen als auch  $CD94^-$ - $CD8\alpha^+$  Zellen, die in der Folge nach ihrer Isolierung weiter untersucht wurden.

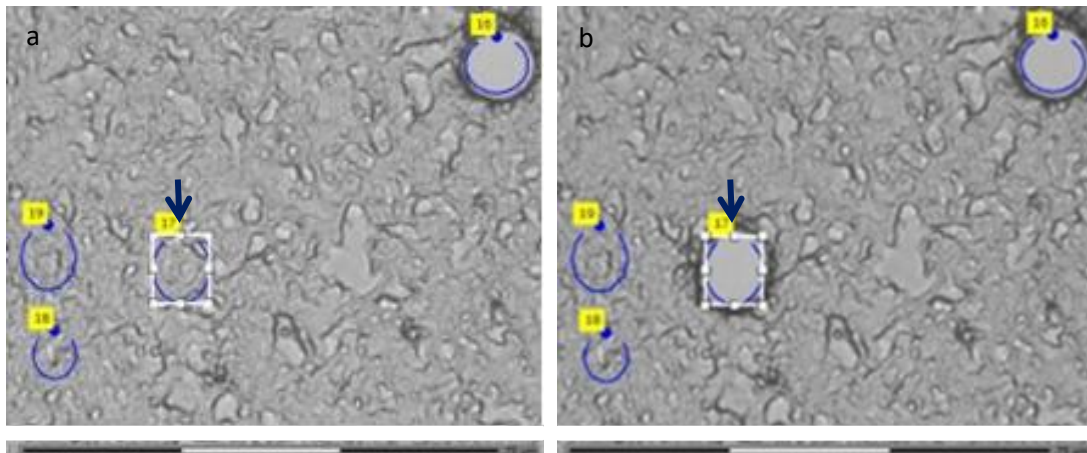
## Ergebnisse



**Abbildung 10: Immunhistochemische Doppelfärbung von CD94<sup>+</sup> und CD8α<sup>+</sup> Zellen in Hirnschnitten von Patient A.**  
**10A: Färbung von CD94<sup>+</sup> Zellen.** Einige Zellen sind exemplarisch markiert: stark CD94<sup>+</sup> Zellen (11), weniger stark positive Zellen (13) und CD94<sup>-</sup> Zellen (9 und 12).  
**10B: Färbung von CD8α<sup>+</sup> Zellen.** Alle exemplarisch markierten Zellen (9, 11, 12, 13) sind CD8α<sup>+</sup>. **10C: DAPI-Kanal.** Bei den markierten Zellen (9, 11, 12, 13) handelt es sich um echte Signale durch immunhistochemisch gefärbte Zellen und nicht um Artefakte. **Abbildung 10D: Überlagerung der Färbungen von CD8α und CD94.** CD94<sup>+</sup>-CD8α<sup>+</sup> Zellen erscheinen orange. Die Zellen 11 und 13 sind orange, also CD94<sup>+</sup>-CD8α<sup>+</sup>. Die lediglich CD8α<sup>+</sup> Zellen 9 und 12 sind rot. Hierbei gibt es allerdings Abstufungen: Zelle 13 ist weniger stark CD94<sup>+</sup> als Zelle 11 und Zelle 9 ist stärker CD8α<sup>+</sup> als Zelle 12. Maßstabsbalken 75 µm.

### 3.1.2 Isolierung von Zellen mittels LCM

Es wurden an zwei Terminen einmal insgesamt 34 Zellen (davon 6 CD94<sup>+</sup>-CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> Zellen und 28 CD94<sup>-</sup>-CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> Zellen) sowie einmal 27 CD94<sup>+</sup>-CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> Zellen isoliert. Davon wurden später für den Vergleich die Pools mit 28 CD94<sup>-</sup>-CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> Zellen und 27 CD94<sup>+</sup>-CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> Zellen weiterverwendet. In Abbildung 11 ist exemplarisch zu sehen, wie die markierten Zellen isoliert wurden.



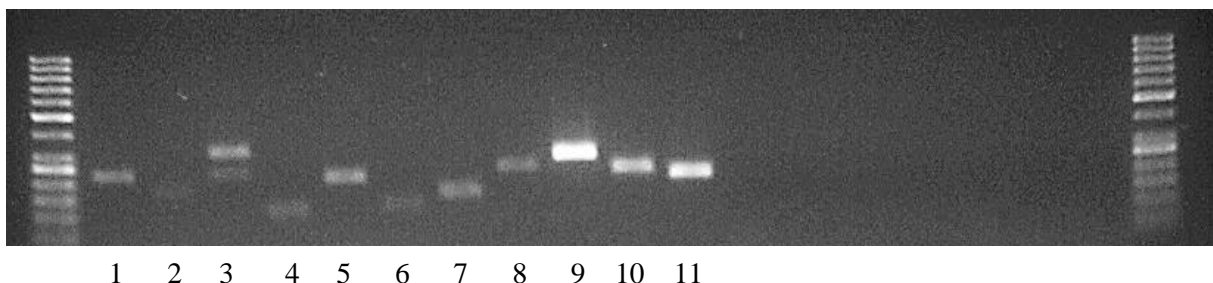
**Abbildung 11: Mikrodissektion einer Zelle im Durchlichtkanal.** (a) Eine Zelle ist bereits isoliert. (b) Eine zweite Zelle (Pfeil) wurde im Verlauf ausgeschnitten. Maßstabsbalken 75 µm.

### 3.1.3 Charakterisierung von CD94<sup>+</sup>-CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> Zellen

#### 3.1.3.1 Primervalidierung an Tonsillen RNA

Für die Primervalidierung wurden die unter 2.5.4.3 vorgestellten Primer zur Analyse verschiedener interessierender Transkripte und ihrer zugrundeliegenden Gene zunächst an aus Tonsillengewebe isolierter RNA getestet.

Es wurde die Multiplex-RT-PCR durchgeführt gefolgt von der semi-nested PCR. In den beiden getesteten Bedingungen für die Multiplex-RT-PCR mit oder ohne *Q-Solution* fand sich kein wesentlicher Unterschied, weswegen in den folgenden Experimenten auf *Q-Solution* verzichtet wurde. Ein Gel (Produkte nach der semi-nested PCR), aus dem ein Teil der Isolierung der Banden erfolgte, ist in Abbildung 12 dargestellt. Für schwache oder fehlende Banden wurden im Anschluss mehr Zyklen hinzugefügt.



**Abbildung 12: Test der Primer an RNA aus Tonsillengewebe.** Auf dem Gel sind die Banden der PCR-Produkte zu sehen. Die Zuordnung der jeweiligen Transkripte zu den Nummern findet sich in nachfolgender Auflistung. An den Rändern des Gels aufgetragen ist die 50 bp DNA Leiter zum Längenabgleich.

Zuordnung der untersuchten Transkripte zu Nummern: 1=NKG2A, 2=NKG2C, 3=NKG2D, 4=NKG2E, 5=NKG2F, 6=NKG2H, 7=CD94, 8=Infy, 9=CD3d, 10=IL-10, 11=HLA-E



Am Endpunkt konnten, ausgehend von Tonsillen RNA, für alle untersuchten Transkripte Banden isoliert werden, die zum Sequenzieren gegeben wurden.

Die Analyse der erhaltenen Sequenzen ergab für alle zu diesem Zeitpunkt untersuchten Transkripte die Zuordnung zu einem Gen. (siehe Tabelle 16)

**Tabelle 16: Ergebnis der Sequenzanalyse der Produkte von Tonsillen RNA**

Untersuchtes Transkript	Ergebnis der Sequenzanalyse
<b>NKG2A</b>	NKG2A/B
<b>NKG2C</b>	NKG2E/H
<b>NKG2D</b>	NKG2D
<b>NKG2E</b>	NKG2E/H
<b>NKG2F</b>	NKG2F
<b>NKG2H</b>	NKG2E/H
<b>CD94</b>	CD94
<b>Infy</b>	Infy
<b>HLA-E</b>	HLA-E
<b>IL-10</b>	IL-10
<b>CD3d</b>	CD3d

NKG2C konnte auch bei einem zweiten separat durchgeführten Test an Tonsillen RNA mit dem verwendeten Primer nicht gesichert werden. Das sequenzierte Produkt hatte eine höhere Übereinstimmung für NKG2E und NKG2H als für NKG2C. Alle übrigen Primer lieferten die gewünschten Sequenzen. Bei NKG2A/B und NKG2E/H handelt es sich jeweils nur um unterschiedliche Splicevarianten eines Gens, deren Unterscheidung nicht relevant war. (Wada et al., 2004)

### 3.1.3.2 Anwendung der Primer an RNA aus verschiedenen Hirnregionen

#### 3.1.3.2.1 Vergleich von Genexpressionsmustern in verschiedenen MS-Läsionen

Darüber hinaus fanden die Primer Anwendung an RNA isoliert aus Teilen von Hirnschnitten aus verschiedenen Hirnregionen des Patienten A. Für die Methodik siehe 2.5.4.3 und 2.5.4.4.

Bei der ersten Probe RNA aus dem Gebiet 10A wurden CD3d, CD94, NKG2E und NKG2H und NKG2A/B, sowie NKG2F/E und HLA-E sicher nachgewiesen. Für den Ansatz für NKG2C konnte erneut lediglich festgestellt werden, dass die resultierende Sequenz mehr Übereinstimmung zu NKG2E/H als zu NKG2C hatte.

Somit wurden sowohl aktivierende als auch inhibierende NKG2-Produkte in der gleichen Region nachgewiesen.

Des Weiteren wurden die Primer für die Analyse einer weiteren RNA-Probe aus dem Hirngebiet 10A (10A-2 genannt) und einer Probe aus Region 12b verwendet.

In der zweiten Probe aus Region 10A (10A-2) wurden erneut NKG2A/B, sowie NKG2E/H und CD94 und HLA-E festgestellt. Beim Ansatz für NKG2C resultierte die Sequenz aus der isolierten Bande erneut in einer höheren Übereinstimmung mit NKG2E/H als mit NKG2C.

In Region 12b dagegen konnte insgesamt nur NKG2F und HLA-E nachgewiesen werden.

Somit gibt es eindeutige Unterschiede in den nachgewiesenen Transkripten in den Regionen 10A und 12b. Zusammengefasst ergibt sich für die verschiedenen Proben das in Tabelle 17 dargestellte Gesamtbild.

**Tabelle 17: Gegenüberstellung der Genexpressionsmuster in verschiedenen RNA-Proben von Patient A und in Tonsillen-RNA unter Angabe der jeweiligen Verdünnung**

Untersuchtes Transkript	Erhaltene Sequenz				
	Tonsille 1:30	10A 1:3000	10A 1:100	10A-2 1:100	12b 1:100
<b>NKG2A</b>	NKG2A/B		NKG2A/B	NKG2A/B	
<b>NKG2C</b>	NKG2E/H		NKG2E/H	NKG2E/H	
<b>NKG2D</b>	NKG2D				
<b>NKG2E</b>	NKG2E/H		NKG2E/H	NKG2E/H	
<b>NKG2F</b>	NKG2F		NKG2F/E		NKG2F
<b>NKG2H</b>	NKG2E/H			NKG2E/H	
<b>CD94</b>	CD94	CD94	CD94	CD94	
<b>Infy</b>	Infy				
<b>HLA-E</b>	HLA-E		HLA-E	HLA-E	HLA-E
<b>IL-10</b>	IL-10				
<b>CD3d</b>	CD3d		CD3d		

### 3.1.3.3 Analyse von LCM isolierten CD94<sup>+</sup>-CD8α<sup>+</sup> Zellen im Vergleich zu CD94<sup>-</sup>-CD8α<sup>+</sup> Zellen

#### 3.1.3.3.1 Ergebnisse der Analyse mit ausgewählten Primern

Im nächsten Schritt wurden die interessierenden Transkripte anhand isolierter RNA aus zwei verschiedenen LMD-isolierten-Zellpools aus Region 10A untersucht. Ein Zellpool bestand aus 28 CD94<sup>-</sup>-CD8α<sup>+</sup>, der andere aus 27 CD94<sup>+</sup>-CD8α<sup>+</sup> Zellen.

Zusätzlich wurde hier noch β-Aktin als konstitutiv exprimiertes Gen (Thellin et al., 1999) mit betrachtet. Dies geschah mit einem Primer, der zuvor an RNA aus dem Gebiet 10A validiert worden war. (siehe Tabelle x1 und x2 im Anhang) Beta-Aktin hatte sich in Voruntersuchungen in unserem Labor als hierfür geeignet erwiesen.

Die Schritte nach der Multiplex-RT-PCR wurden zwei Mal mit unterschiedlicher Verdünnung und Zyklenanzahl durchgeführt (Ansatz A und Ansatz B). (siehe 2.5.4.4)

Mit Ansatz A konnten aus der RNA aus CD94<sup>-</sup>-CD8α<sup>+</sup> Zellen nur für β-Aktin, aus CD94<sup>+</sup>-CD8α<sup>+</sup> Zellen für den PCR-Ansatz für β-Aktin und NKG2A und NKG2C verwendbare Banden in der entsprechenden Länge nachgewiesen werden.

Bei Ansatz B waren Banden zu sehen für β-Aktin aus der RNA der CD94<sup>-</sup>-CD8α<sup>+</sup> Zellen und für β-Aktin und NKG2A und NKG2C aus CD94<sup>+</sup>-CD8α<sup>+</sup> Zellen wie zuvor auch.

Für Ansatz A und Ansatz B wurden ausgewählte Banden zum Sequenzieren gegeben.

Hierbei bestätigte sich die Sequenz für die β-Aktin Banden in beiden Zellpools und für NKG2A/B in den CD94<sup>+</sup>-CD8α<sup>+</sup> Zellen.

Die Banden in dem Ansatz für NKG2C entsprachen laut *Nucleotide BLAST* NKG2A, NKG2B und NKG2C. In der manuellen Gegenüberstellungen sowie in einer Auswertung mithilfe des



Analyseprogramms *T-Coffee* wurden schließlich Unterschiede in der Sequenz festgestellt, die zeigten, dass es sich um NKG2A/B handelt.

Zusammenfassend konnte sowohl im CD94<sup>+</sup>-CD8α<sup>+</sup> als auch CD94<sup>-</sup>-CD8α<sup>+</sup> Zellpool β-Aktin nachgewiesen werden. Im Transkriptom der CD94<sup>+</sup>-CD8α<sup>+</sup> Zellen wurden zudem NKG2-Genprodukte festgestellt, nämlich NKG2A/B. Mit dem Primer für NKG2C wurde bei der Analyse der Zellpools ebenfalls NKG2A/B vervielfältigt.

### 3.1.3.3.2 NGS Analysen

Mit einem Teil der isolierten RNA aus den beiden unterschiedlichen Zellpools aus CD94<sup>+</sup>-CD8α<sup>+</sup> und CD94<sup>-</sup>-CD8α<sup>+</sup> Zellen wurde von E. Beltran eine NGS Analyse durchgeführt.

Im Transkriptom beider Pools (also sowohl in CD94<sup>+</sup>-CD8α<sup>+</sup> als auch CD94<sup>-</sup>-CD8α<sup>+</sup> Zellen) konnte er mittels NGS die konstante Domäne der α- und der β-Kette des TZR nachweisen.

## 3.2 Antigensuche für den T-Zellklon IP2-8S1

In den nachfolgenden Abschnitten werden die Ergebnisse dieser Arbeit bei der Antigensuche von IP2 vorgestellt. Dabei werden auch Voruntersuchungen zu Transfektionsbedingungen, verschiedenen APZ, sowie zu im Versuchsablauf auftretenden Problemen beschrieben. Danach wird auf die Resultate der Untersuchungen von Kandidatenantigenen und verschiedenen Peptidbibliotheken eingegangen.

### 3.2.1 Charakterisierung von IP2 TZR Transfektanten

Um optimale Bedingungen für die Antigensuche zu erreichen, gilt es, einen Klon von IP2 zu verwenden, der sehr hohe Expressionsraten an CD8 und CD3 hat, sowie eine gute CD3-Aktivierung bei geringer Spontanaktivität. Hierfür wurden vor Beginn der Antigensuche drei IP2 Hybridom-Klone miteinander verglichen.

#### 3.2.1.1 Vergleich der CD8 und CD3 Expression sowie Aktivierbarkeit von IP2 Klonen

Die Aktivierbarkeit, CD3 und CD8 Expression der IP2-8S1 Klone 3, 7 und 11 wurden verglichen.

##### 3.2.1.1.1 CD3-Aktivierung dreier IP2 Klone

Um die Aktivierbarkeit der IP2-8S1 Klone 3, 7 und 11 über den CD3-Rezeptor zu testen wurde am Vortag der Durchflusszytometrie eine CD3-Aktivierung vorbereitet. Eine gute CD3-Aktivierbarkeit mit nachfolgender sGFP-Expression ist von immenser Bedeutung für die Antigensuche, da nur so unter dem Mikroskop aktivierte T-Zellen erkannt werden können und die darunterliegende APZ mit ihrem kodierenden Plasmid isoliert werden kann.

Beim Vergleich der drei oben genannten Klone in der Durchflusszytometrie schnitt Klon 11 bei der CD3-Aktivierung am besten ab.

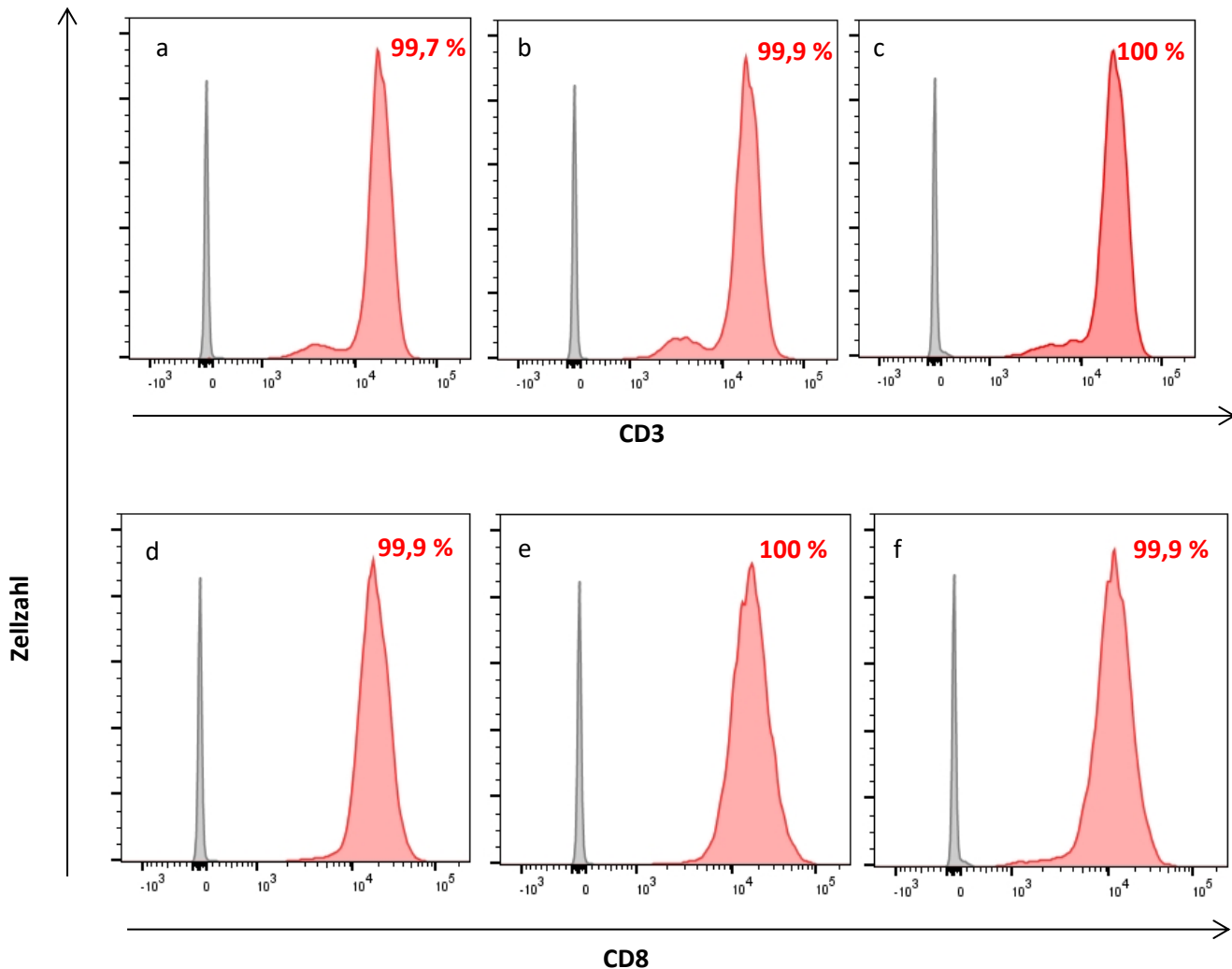
##### 3.2.1.1.2 CD3 und CD8 Expression dreier IP2 Klone im Vergleich

Zusätzlich wurden Zellen der oben schon genannten drei Klone vor Durchführung der Durchflusszytometrie mit APC-gekoppelten Antikörpern gegen CD3 und CD8 und den jeweiligen Isotyp-Kontrollen gefärbt. (siehe 2.1.6)

## Ergebnisse

Die Expressionsrate von CD3 und CD8 waren bei allen Klonen annähernd 100 %. Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie sind in Abbildung 13 dargestellt.

Somit war der entscheidende Faktor die CD3-Aktivierbarkeit. Diese war bei Klon 11 am besten (siehe 3.2.1.1.1), weswegen dieser für weitere Experimente in Kultur behalten wurde.



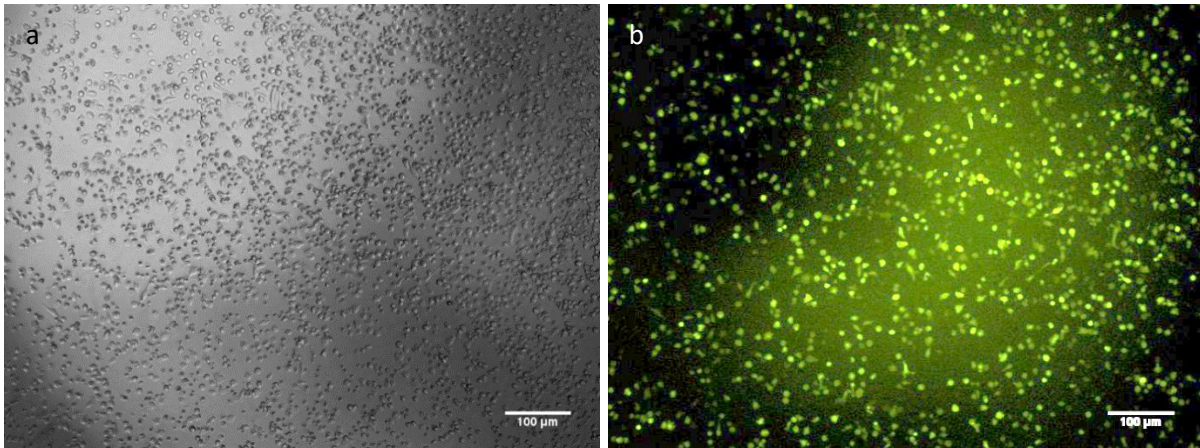
**Abbildung 13: Durchflusszytometrische Analyse der CD3 und CD8 Expression dreier IP2 Klonen.** X-Achse: APC-Stärke entsprechend der Anfärbbarkeit mit CD3-Ak bzw. CD8-Ak. Y-Achse: Zellzahl. Die Isotyp-Kontrollen werden durch die grauen Kurven dargestellt, mit den CD3- bzw. CD8-Ak angefärbte Zellen entsprechen den roten Kurven. Klon 3: (a) CD3 Expression bei 99,7 % der Zellen, (d) CD8 Expression bei 99,9 %; Klon 7: (b) CD3 Expression bei 99,9 %, (e) CD8 Expression bei 100 %; Klon 11: (c) CD3 Expression bei 100 %, (f) CD8 Expression bei 99,9 %.

### 3.2.1.1.3 Bedeutung von CD3-Aktivierung und Färbung von CD3 und CD8 bei weiterführenden Experimenten

Auch im Rahmen weiterer Experimente wurden die CD3-Aktivierung sowie die Expression von CD3 und CD8 überprüft. So etwa bei den Reklonierungen (siehe 3.2.1.2.1) oder im Falle der CD3-Aktivierung als Positivkontrolle der Aktivierbarkeit bei sämtlichen Antigensuchexperimenten.

Die Aktivierung der Zellen wurde dafür grundsätzlich 16h nach Ansetzen der CD3-Aktivierung mittels Analyse der NFAT-sGFP-Expression am Fluoreszenzmikroskop und teils mittels Durchflusszytometrie überprüft. Zusätzlich konnte im Überstand die IL-2 Konzentration mittels ELISA bestimmt werden.

Eine CD3-Aktivierung von Klon 11 unter dem Fluoreszenzmikroskop ist in Abbildung 14 dargestellt.



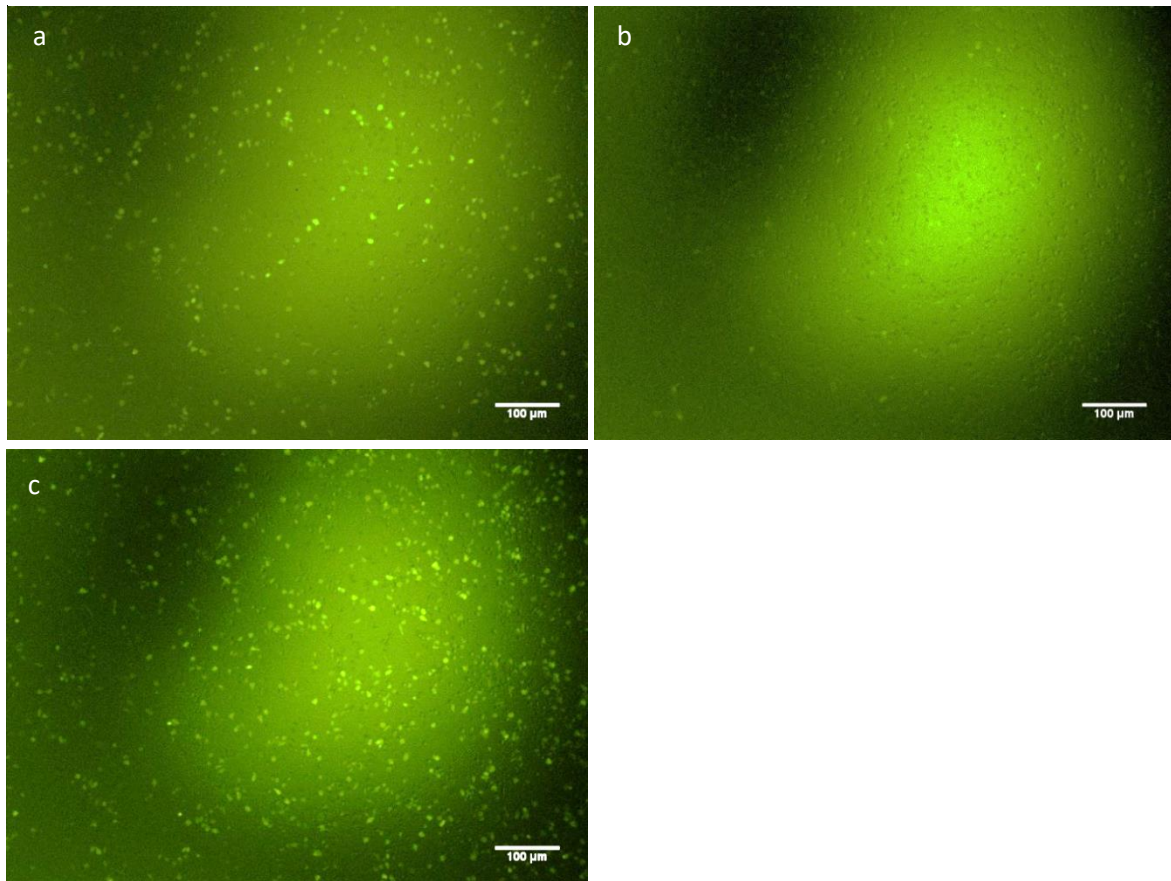
**Abbildung 14: CD3-Aktivierung von IP2 Klon 11 unter dem Fluoreszenzmikroskop.** (a) Durchlichtkanal, (b) Fluoreszenzkanal. Aktivierter T-Hybridomzellen stellen sich grün dar. Maßstabsbalken 100 µm.

Trotz guter Aktivierbarkeit waren nicht 100 % der Zellen sGFP<sup>+</sup> und die Stärke der sGFP-Expression war zwischen den Zellen des gleichen Klons teils unterschiedlich. Die CD3-Aktivierung musste zu jedem Experiment als Kontrolle mitgeführt werden, da ein Klon mit der Zeit immer schlechter aktivierbar werden konnte und somit zu falsch negativen Ergebnissen in der Antigensuche hätte führen könnte.

### **3.2.1.2 Methoden zur Verringerung der Spontanaktivierung von IP2-8S1 Hybridomzellen und Untersuchung der Ursachen**

#### **3.2.1.2.1 Reklonierung IP2 Klon 11**

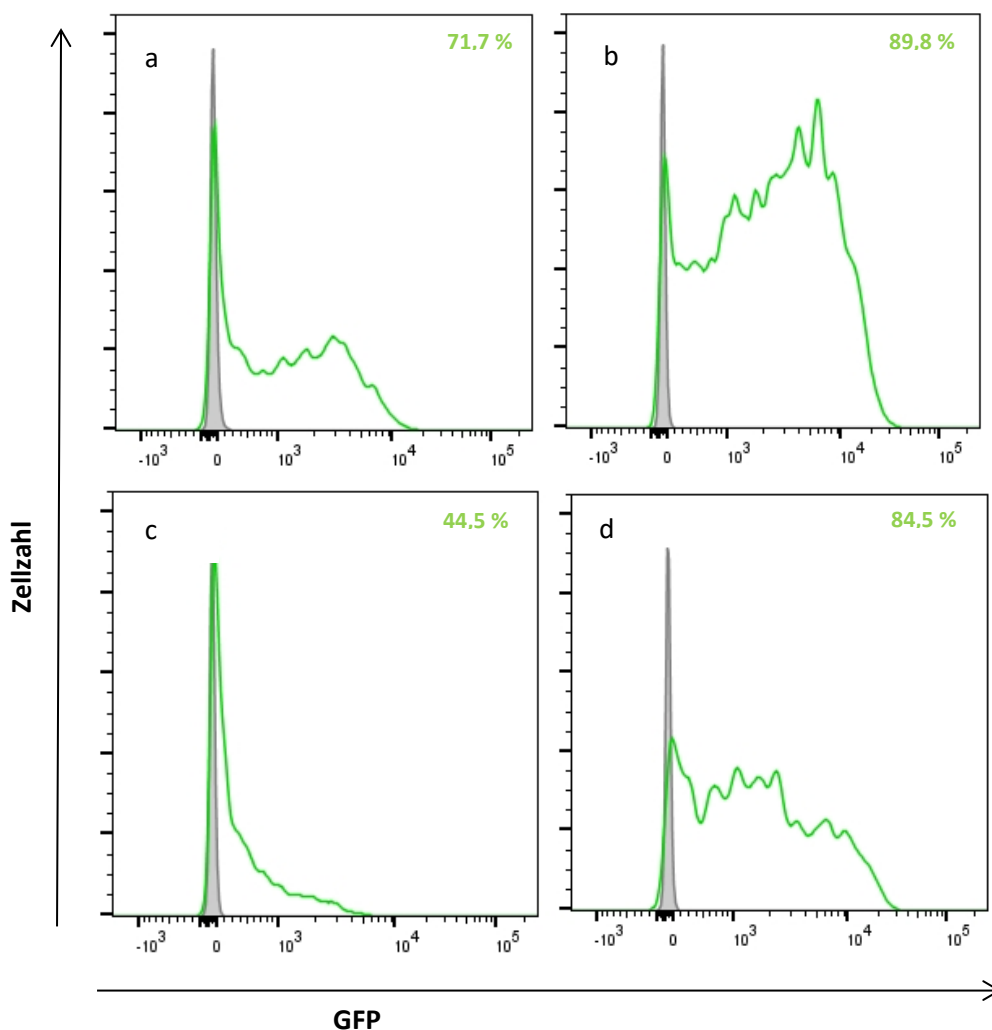
Um die bereits mehrfach erwähnte Spontanaktivierung der T-Hybridomzellen möglichst gering zu halten, wurde im Laufe der Arbeiten für diese Dissertation zweimal eine Reklonierung durchgeführt. Ein Ausschnitt der Ergebnisse einer dieser Vorgänge wird hier nun exemplarisch dargestellt. Es ist wichtig einen Klon für die Antigensuche zu verwenden, der sowohl gut aktivierbar ist (CD3-Aktivierung), als auch eine sehr geringe Spontanaktivierung aufweist.



**Abbildung 15: Vergleich der Aktivierbarkeit dreier reklonierter Klone von IP2 Klon 11 unter dem Fluoreszenzmikroskop.** (a) Klon 1, (b) Klon 2 und (c) Klon 4. Aktivierte T-Hybridome leuchten grün. Bei Klon 4 war der Anteil aktivierter Zellen am größten. Klon 2 war am schlechtesten aktivierbar. Maßstabsbalken 100 µm.

Die drei dargestellten reklonierten Klone sind Klon 1, Klon 2 und Klon 4. Unter dem Mikroskop war die auftretende Spontanaktivierung bei allen reklonierten Klonen ähnlich gering. Die Aktivierbarkeit zeigte sich unter dem Mikroskop unterschiedlich für die einzelnen Klone, wobei Klon 2 am schlechtesten abschnitt und bei Klon 4 der Anteil aktivierter Zellen am größten war.

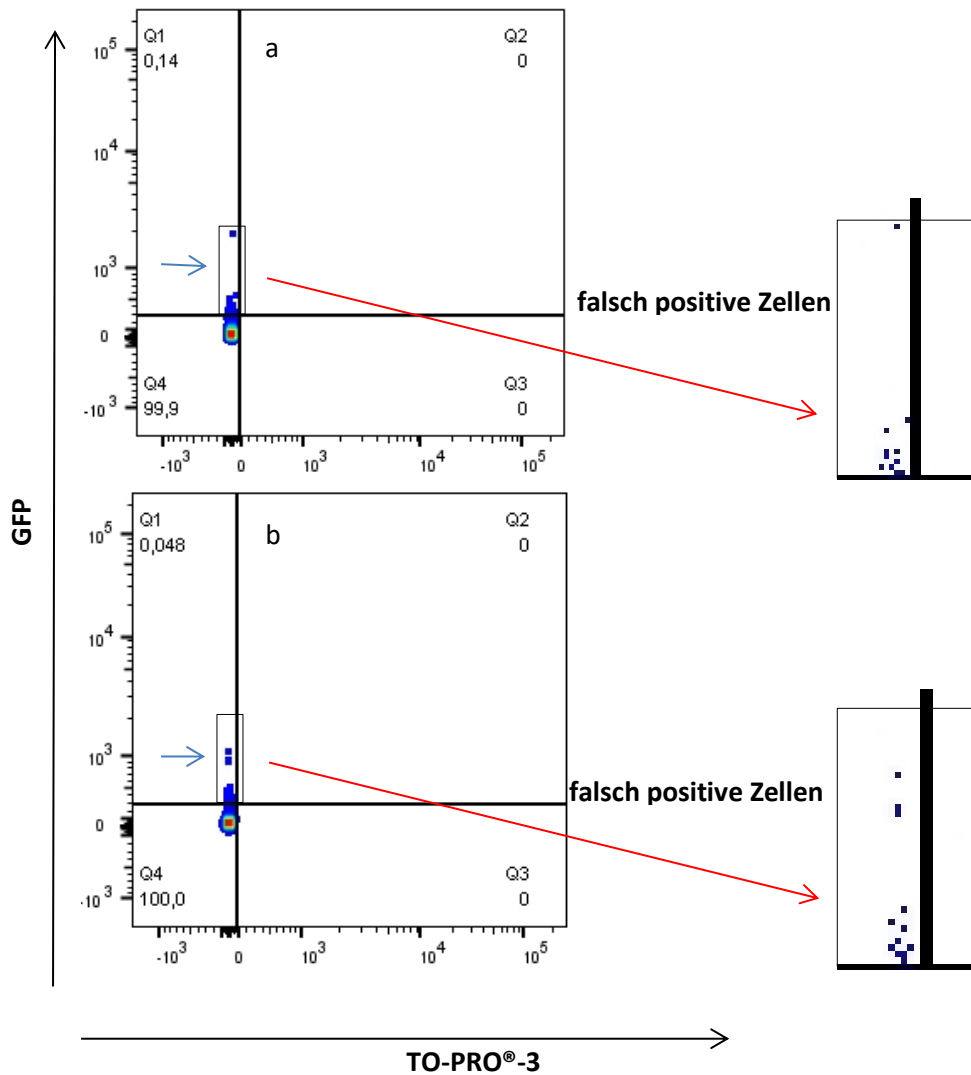
Zusätzlich zur mikroskopischen Untersuchung wurden die reklonierten Klone in der Durchflusszytometrie auf CD3-Aktivierbarkeit, Spontanaktivierung sowie die Expression von CD3 und CD8 getestet und mit dem ursprünglichen Klon 11 verglichen. Ziel war es, den Klon auszuwählen, der die besten Voraussetzungen für weitere Versuche bot.



**Abbildung 16: Vergleich der Aktivierbarkeit von drei Reklonierungen von IP2 Klon 11 mit dem ursprünglichen Klon 11 in der Durchflusszytometrie.** (a) Klon 11, (b) Klon 4, (c) Klon 2, (d) Klon 1. Y-Achse: Zellzahl, X-Achse: Intensität der sGFP-Expression. Die graue Kurve stellt die jeweilige NC dar, die grüne Kurve die CD3-Aktivierung der T-Hybridome. Der Anteil sGFP-exprimierender Zellen bei CD3-Aktivierung lag beim ursprünglichen Klon 11 bei 71,7 %, bei Klon 4 (rekloniert) bei 89,8 %, bei Klon 2 (rekloniert) bei 44,5 %, und bei Klon 1 (rekloniert) bei 84,5 %.

In der Durchflusszytometrie bestätigten sich die Vorergebnisse aus der Fluoreszenzmikroskopie. Der reklonierte Klon 2 war mit nur etwa 45 % schlechter aktivierbar als die reklonierten Klone 4 und 1 mit etwa 90 bzw. 85 %. Der ursprüngliche Klon 11 wies eine Aktivierung von etwa 72 % auf.

## Ergebnisse



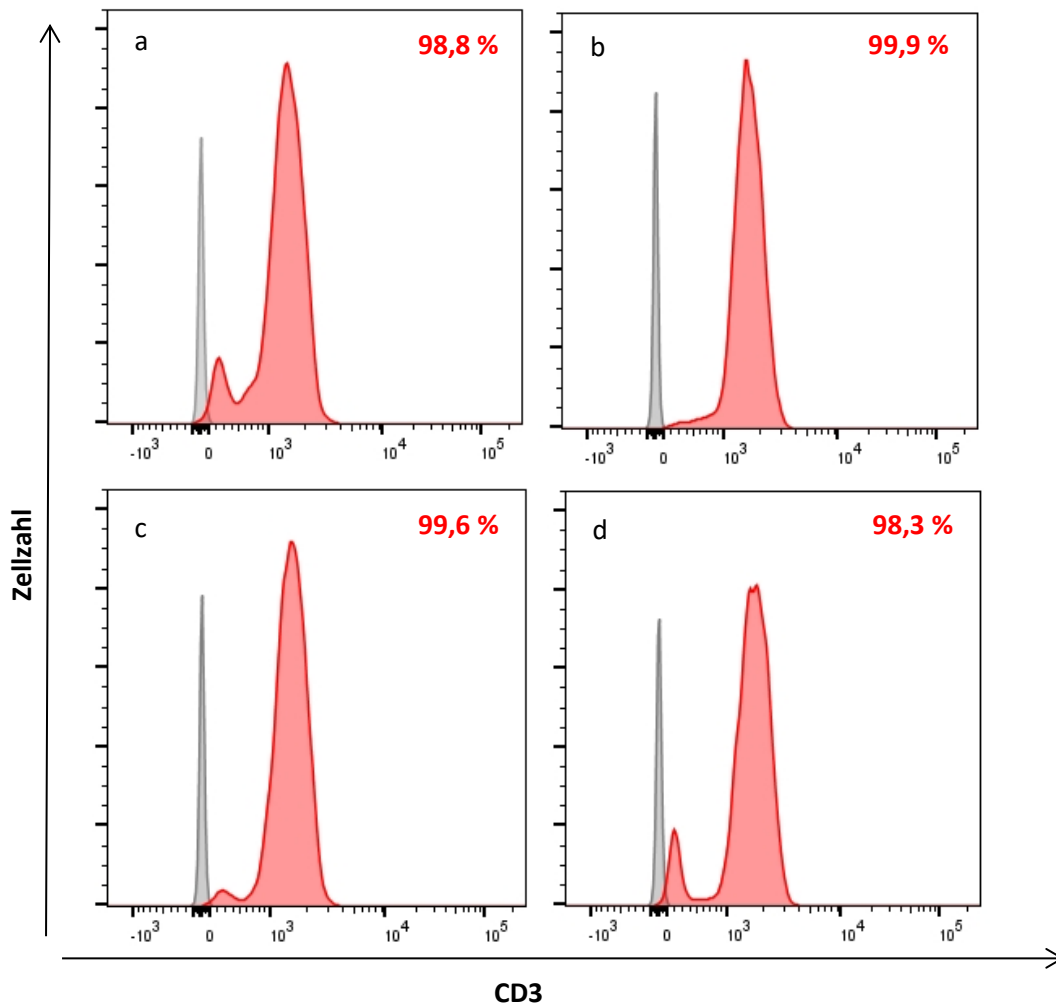
**Abbildung 17: Negativkontrollen von (a) Klon 11 und (b) Klon 4 (rekloniert).** X-Achse: Färbung toter Zellen mittels TO-PRO®-3, Y-Achse: Intensität der sGFP-Expression. In der Darstellung der Durchflusszytometrie-Daten als Streudiagramm sind einzelne FITC<sup>+</sup> Zellen im Quadranten 1 (Q1, links oben), entsprechend einer sGFP-Expression und somit Spontanaktivierung, sichtbar. Zellen, die durch das Rechteck mit dem blauen Pfeil markiert sind, wären unter dem Mikroskop falsch positiv. Die markierten Bereiche wurden herausvergrößert (mit dem roten Pfeil gekennzeichnet, rechte Bildhälfte), um die einzelnen Zellen besser sichtbar zu machen.

Durch Überprüfung der Negativkontrollen sollten die Klone ausgewählt werden, die am wenigsten Spontanaktivität aufwiesen. Der ursprüngliche Klon 11 zeigte eine Spontanaktivierung von 0,14 %. Die reklonierten Stämme lagen mit ihrer Spontanaktivierung prozentual alle unter dem ursprünglichen Klon, wobei Klon 4 spontanaktiver war und mehr Zellen mit einem erhöhten FITC-Signal, entsprechend einer sGFP-Expression, enthielt, als die beiden anderen. Solche Zellen, wie in Abbildung 17 markiert, wären dann unter dem Mikroskop u. U. falsch positiv. Klon 2 war zwar am wenigsten spontanaktiv, aber auch am schlechtesten gezielt aktivierbar. Klon 1 schien gut aktivierbar bei gleichzeitig geringer Spontanaktivierung und wäre damit der beste Kandidat für weitere Experimente.

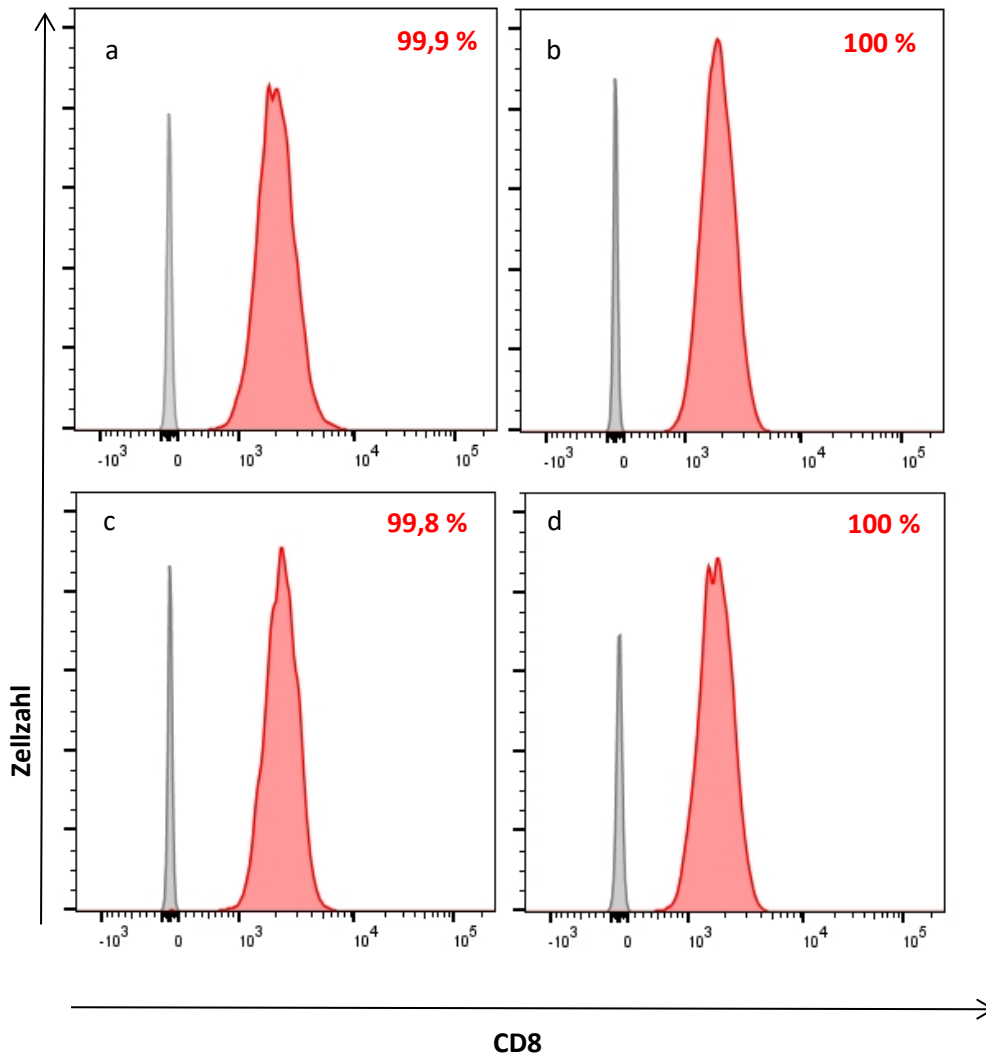


**Tabelle 18: Prozentuale Anteile spontanaktiver Zellen bei verschiedenen Klonen zu einem Untersuchungszeitpunkt**

Klon	Spontanaktivierung in %
Klon 11	0,14
Klon 4 (rekloniert)	0,048
Klon 2 (rekloniert)	0,016
Klon 1 (rekloniert)	0,033



**Abbildung 18: Durchflusszytometrische Analyse der IP2-Zellen mit einem APC-markierten CD3-Antikörper im Vergleich zur Isotyp-Kontrolle.** X-Achse: APC-Stärke entsprechend der Anfärbbarkeit mit CD3-Ak. Y-Achse: Zellzahl. Isotyp-Kontrollen entsprechen den grauen Kurven, mit CD3-Ak angefärbte Zellen entsprechen den roten Kurven. (a) Klon 11, (b) Klon 4 (rekloniert), (c) Klon 2 (rekloniert), (d) Klon 1 (rekloniert). Die Anzahl an APC<sup>+</sup> Zellen entsprechend der CD3 Expression lag bei allen Klonen nahe 100 %.



**Abbildung 19: Durchflusszytometrische Analyse der IP2-Zellen mit einem APC-markierten CD8-Antikörper im Vergleich zur Isotyp-Kontrolle.** X-Achse: APC-Stärke entsprechend der Anfärbbarkeit mit CD8-Ak. Y-Achse: Zellzahl. Die grauen Kurven stellen die Isotyp-Kontrollen dar, mit CD8-Ak angefärbte Zellen entsprechen den roten Kurven. (a) Klon 11, (b) Klon 4 (rekloniert), (c) Klon 2 (rekloniert), (d) Klon 1 (rekloniert). Über alle Klone hinweg waren nahezu 100% der Zellen APC<sup>+</sup> und somit CD8 exprimierend.

Die CD3 und CD8 Expression (Abbildungen 18 und 19) lag zwischen 98,3 und 100 %. Somit wären unter diesem Gesichtspunkt alle Klone verwendbar gewesen.

Zusätzlich zur Färbung mit den CD3 und CD8 spezifischen Antikörpern wurden Isotyp-Kontrollen mitgeführt. Ausgewählte Klone wurden in Kultur gehalten und jeweils mehrere Aliquots für Versuche eingefroren.

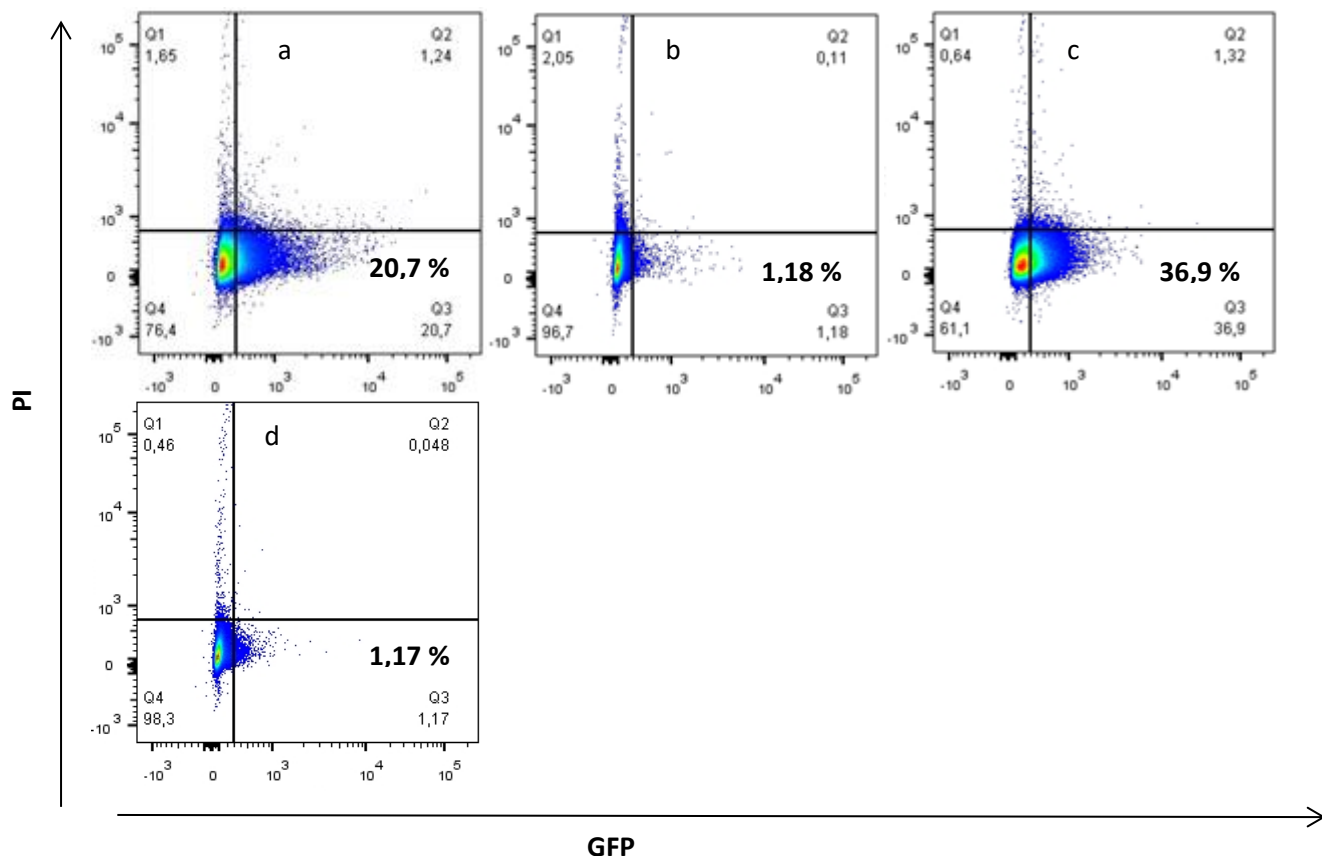
### 3.2.1.2.2 Untersuchungen zu spontanaktiven T-Hybridomen mittels Transkriptomanalyse

Wie unter 2.4.1.4 und 2.5.4.5 geschildert wurden spontanaktivierte GFP<sup>+</sup> T-Hybridome mit nicht aktivierten GFP<sup>-</sup> T-Hybridomen verglichen.

Zu Beginn waren alle untersuchten Populationen von T-Hybridomzellen in der Durchflusszytometrie vergleichbar mit GFP<sup>+</sup> Anteilen zwischen etwa 0,85 % und etwa 2 %. Die Zellen wurde wie in Material und Methoden (siehe 2.4.1.4) beschrieben getrennt nach GFP<sup>+</sup> und GFP<sup>-</sup> Zellen mittels Durchflusszytometrie isoliert. Das weitere Vorgehen ist unter 2.3.10.2 nachzulesen.



Bei der erneuten Analyse mittels Durchflusszytometrie fiel auf, dass spontanaktivierte Zellen und/oder deren Nachkommen z. T. innerhalb von Tagen nicht mehr aktiviert waren und bis dahin nicht aktivierte Zellen und/oder deren Nachkommen sich spontan aktiviert hatten. (siehe Abbildung 20) Auch unter dem Fluoreszenzmikroskop fand sich bei den als GFP<sup>+</sup> eingeteilten Zellen weiterhin eine erhöhte Frequenz sGFP-exprimierender Zellen gegenüber den als GFP<sup>-</sup> klassifizierten Zellpopulationen, aber keinesfalls eine 100 % zu 0 % Unterscheidung.



**Abbildung 20: Getrennt isolierte Zellpopulationen von verschiedenen T-Hybridom-Klonen und ihre sGFP-Expression.** X-Achse: sGFP-Expression, Y-Achse: Färbung toter Zellen mit PI. (a) Klon 5 (rekloniert) (GFP<sup>+</sup> Population nach einer Woche), (b) Klon 5 (rekloniert) (GFP<sup>-</sup> Population nach einer Woche), (c) Klon 11 (GFP<sup>+</sup> Population nach einer Woche), (d) Klon 11 (GFP<sup>-</sup> Population nach einer Woche). Die jeweils lebenden, aktivierten GFP<sup>+</sup> Anteile sind im Quadranten 3 (Q3, rechts unten) zu sehen. Dieser Anteil schwankte zwischen den verschiedenen Populationen zwischen 1,17 % bei zuvor GFP<sup>-</sup> Populationen und 36,9 % bei ehemals GFP<sup>+</sup> Populationen.

Abbildung 20 zeigt, dass eine Woche zuvor zu 100 % GFP<sup>+</sup> Populationen von Zellen nun noch zwischen 21 und 37 % sGFP exprimieren. Zellpopulationen, die vor einer Woche noch zu 100 % GFP<sup>-</sup> waren, sind in der Zwischenzeit wieder etwa zu 1 % sGFP-exprimierend.

Von diesen Zellproben wurde die stark sGFP-exprimierenden und sicher GFP<sup>-</sup> Zellen wiederum getrennt isoliert. Aus ihnen wurde die RNA für die Transkriptomanalyse mittels NGS isoliert.

Wie bereits vermutet, deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass es sich bei der Spontanaktivierung um einen sehr dynamischen Prozess handelt. Die molekularen Grundlagen sollten mittels NGS Analyse des Transkriptoms näher erforscht werden, in der Hoffnung, unterschiedlich hochregulierte Gene zu finden, auf deren Expression von außen Einfluss genommen werden könnte.

Hierzu verglich E. Beltran die erhaltenen NGS Daten von GFP<sup>+</sup> und GFP<sup>-</sup> T-Hybridomen mit Referenzdaten aus dem Mausgenom (*Mus musculus*) und suchte nach Unterschieden in der Frequenz von Transkripten zwischen den GFP<sup>+</sup> und GFP<sup>-</sup> Zellen. Er konnte aber in der Analyse der erhaltenen NGS Daten keine Unterschiede in der Expressionsfrequenz von untersuchten Genen feststellen.

### 3.2.2 Aktivierung durch antigenpräsentierende Zellen

Wie in vivo benötigen T-Zellen in vitro antigenprozessierende und -präsentierende Zellen. Im Gegensatz zu B-Zellen sind sie nicht in der Lage, Antigene in ihrer nativen Form zu binden und zu erkennen.

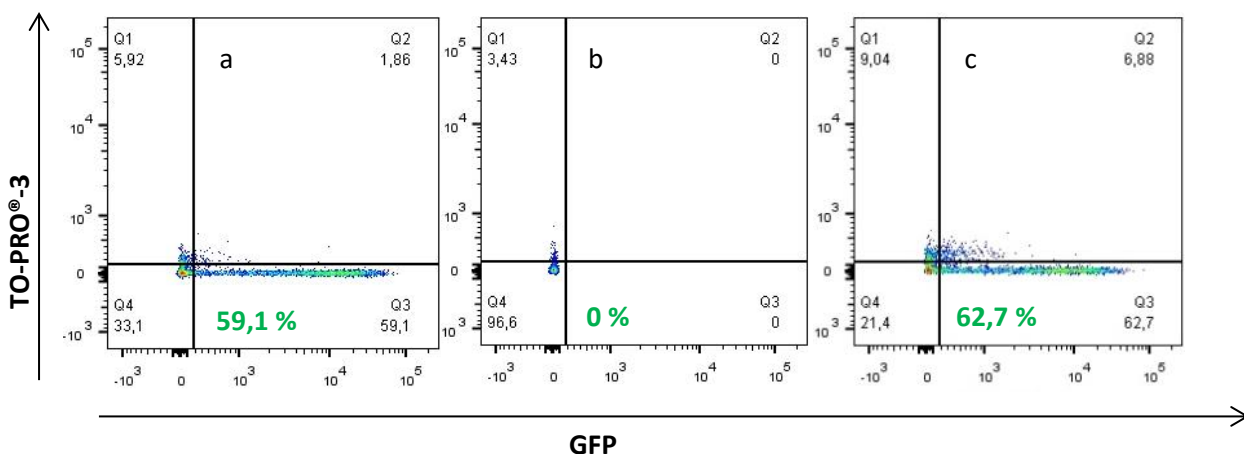
Übertragen auf die in vitro Versuche in der Zellkultur wurden für die folgenden Experimente zur Antigensuche zwei Sorten antigenpräsentierender Zellen verwendet, zum einen LCL-Zelllinien und zum anderen sogenannte COS-7 Zellen.

#### 3.2.2.1 Voruntersuchungen zu Transfektionsbedingungen der antigenpräsentierenden Zellen

Um möglichst optimale Transfektionsbedingungen bei der Antigensuche zu haben, wurden die verschiedenen Transfektionsmethoden an den unterschiedlichen Zellarten im Vorfeld getestet.

##### 3.2.2.1.1 Vergleich der Transfektionseffizienz von FuGENE® und Nucleofector bei COS-7 Zellen

COS-7 Zellen wurden parallel mit Nukleofektion und FuGENE® mit pcDNA-NFAT-sGFP transfiziert. Hierbei zeigte sich nach 72 Stunden in der Durchflusszytometrie eine vergleichbare Effizienz. Bei FuGENE® exprimierten 59 % das transfizierte sGFP, mit dem Nucleofector waren es 63 %. Tote Zellen wurden mit TO-PRO®-3 gefärbt, wodurch tote Zellen auf dem APC-Kanal erkannt und aus der Analyse ausgeschlossen werden konnten.



**Abbildung 21: Vergleich der Transfektionseffizienz mittels FuGENE® und Nukleofektion.** X-Achse: sGFP-Expression, Y-Achse: Färbung toter Zellen mit TO-PRO®-3 (Q1+Q2). Bei Transfektion mittels (a) FuGENE® exprimierten etwa 59 % der analysierten Zellen sGFP, bei Transfektion mittels (c) Nucleofector etwa 63 %. (b) In der Negativkontrolle gab es keine sGFP-Expression. Die Anzahl der toten Zellen (TO-PRO®-3) überwog ebenfalls bei der Nukleofektion mit etwa 16 % vs. 8 % bei FuGENE®.

In diesem Fall waren mehr tote Zellen in der Transfektion mit dem Nucleofector festzustellen (etwa 16 % gegen 8 % bei FuGENE®). In der Negativkontrolle war keine sGFP-Expression zu sehen.

Somit waren beide Methoden grundsätzlich für die Transfektion von COS-7 Zellen geeignet. Gründe, dass in dieser Arbeit mit Nukleofektion gearbeitet wurde, werden unter 4.2.1 diskutiert. U. a. ist die Amplifikationsrate der PECP-Kopien in den COS-7 Zellen nach Transfektion mit dem Nucleofector höher. (Rühl, 2016)

### **3.2.2.1.2 Transfektionseffizienz verschiedener Lösungen, Programme und Vektoren bei LCL-Zellen im Vergleich**

#### **3.2.2.1.2.1 Nukleofektion mit SG und SF Lösung und allgemeine Bedingungen**

Da für die Transfektion von LCL-Zellen keine klaren Empfehlungen im Labor vorlagen, wurden nach Konsultation des Nucleofector Herstellers Lonza zunächst mehrere Programme und Lösungen getestet, um die beste Variante für das Überleben der Zellen und die Transfektionseffizienz zu ermitteln.

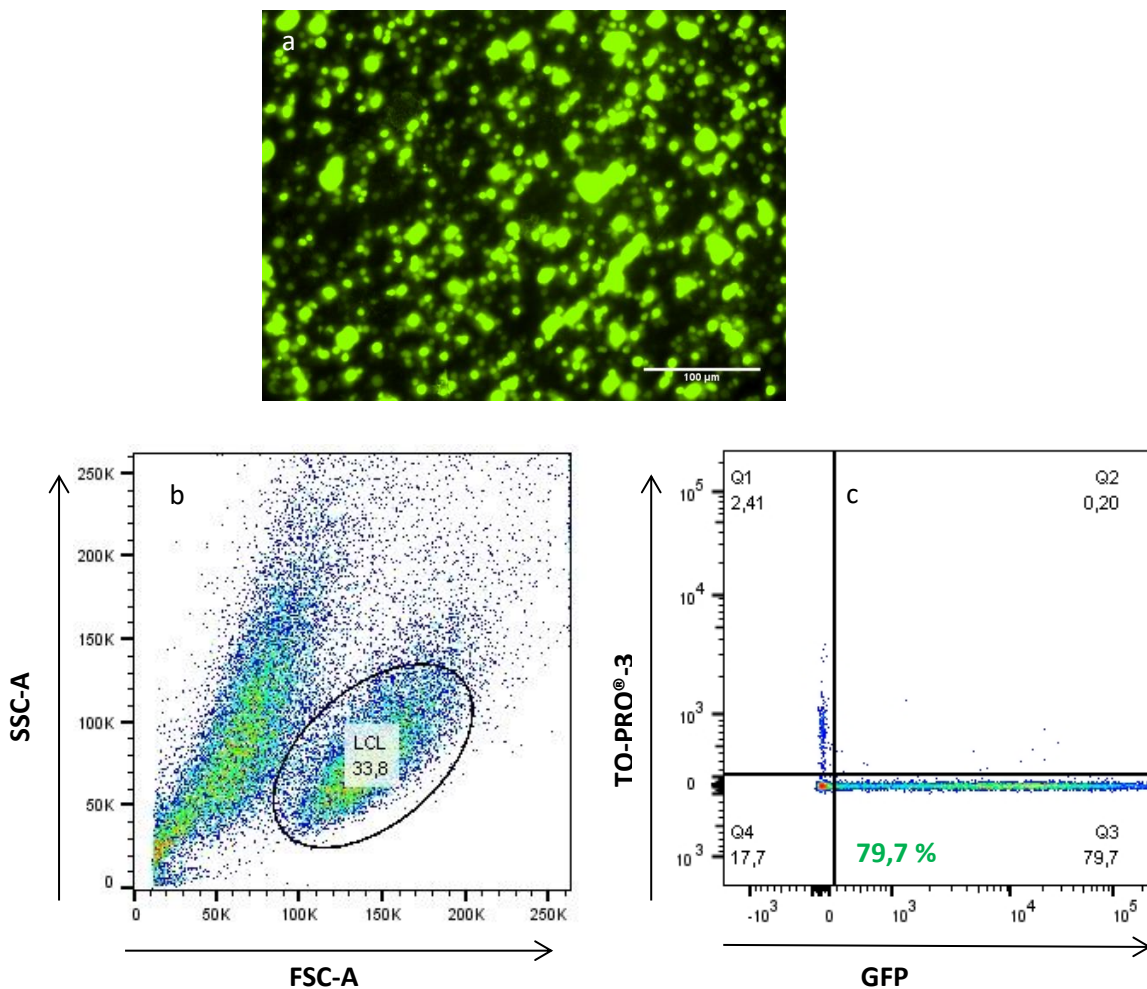
Beim ersten Test wurde die SF Lösung mit dem Programm EH 100 im Nucleofector gepulst und die SG Lösung mit dem Programm DS 104. Repräsentativ wurden zwei LCL-Zelllinien getestet, Linie 28 und 17490. Wichtig hierbei war es, zwei Klone zu verwenden, die nicht endogen GFP exprimieren. (siehe Tabelle 13) Als Plasmid wurden je 2 µg ptt5 sGFP transfiziert. Über einen Zeitraum von sieben Tagen wurden die sGFP-Expression und das Zellüberleben mittels wiederholter Untersuchungen am Fluoreszenzmikroskop und mittels Durchflusszytometrie beobachtet.

Die Expressionsrate von sGFP in den Zellen stieg dabei über die Tage in den verschiedenen Bedingungen bis auf Werte von annähernd 90 % sGFP-Expression in der analysierten Zellpopulation am 4. Tag nach Transfektion. Auch am 7. Tag nach Transfektion exprimierten die LCL-Zellen noch sGFP. Es fiel allerdings auf, dass viele Zellen durch den Transfektionsvorgang starben und der Anteil lebender Zellen erst über die Tage hinweg anstieg. Die sGFP-Expression in der Linie 28 lag an den verschiedenen Tagen zwischen etwa 25 und 40 % mit der SF Lösung, in der Linie 17490 zwischen 23 und 90 % mit derselben Lösung. Mit der SG Lösung betrug der Anteil sGFP-exprimierender Zellen zwischen 15 und 80 % für Linie 28, und zwischen 8 und 80 % für Linie 17490.

Um die Rate der überlebenden Zellen noch zu erhöhen und die Transfektionsbedingungen weiter zu verbessern, wurde noch ein weiterer Test durchgeführt. Anhand der Analysen wurde hierfür die SF Lösung ausgewählt, weil unter dem Mikroskop die mit dieser Lösung behandelten Zellen von zwei unabhängigen Untersuchern (G. Rühl und M. Amft) als vitaler beurteilt wurden. Zudem war der Anteil von Zellen gegenüber sonstiger Debris in der Durchflusszytometrie mit dieser Transfektionslösung über alle Bedingungen hinweg betrachtet höher. Insgesamt wurde angenommen, dass das Überleben mit der SF Lösung besser sei, auch wenn für den Klon 28 die sGFP-Expression am Spitzentag mit 80 % bei der SG Lösung gegenüber 40 % bei der SF Lösung höher war. Zu Beginn (erster Tag nach Transfektion) war aber die SF Lösung mit etwa 25 % gegenüber 15 % sGFP-Expression auch bei diesem Klon deutlich überlegen. Zusätzlich waren vor allem bei Klon 28 wesentlich mehr Zellen als Debris mit der SF Lösung gegenüber der SG Lösung in der Durchflusszytometrie zu sehen. Die Wahl der SF Lösung wurde auch in Folgeexperimenten bestätigt, so auch im Rahmen der Kokultur mit ptt5 GABA und ptt5 CSRP2 transfizierten Zellen, bei der die Transfektionskontrollen mit Klon 28 und 17490 am 4. Tag sGFP-Expressionsraten von 78 bzw. 80 % lieferten. (siehe 3.2.2.2.2)

Die Behandlung der Zellen nach der Transfektion wurde in dem zweiten Test mit der SF Lösung und dem Klon 17490 optimiert, u. a. durch vorübergehende Aufbewahrung der transfizierten Zellen in

offenen 2 ml Reaktionsgefäßen im Inkubator. Die schließlich zur weiteren Aufbewahrung verwendeten Zellkulturflaschen wurden auf eine Kante gestellt, um den Zellkontakt zu erhöhen, was förderlich für die Bildung von Zellaggregaten ist. Somit sollte die Zellerholung nach Transfektion verbessert werden. Zusätzlich wurde die Debris nach Aufwirbelung eine Nacht nach Transfektion abgetragen. Für alle weiteren Versuche wurde anlehnend hieran genauso verfahren. Durch diese zusätzlichen Verbesserungen der Methode, konnte der Anteil lebender Zellen und die sGFP-Expression noch einmal verbessert werden. So lag die sGFP-Expression am ersten Tag nach der Transfektion schon bei etwa 80 % der analysierten Zellen und am vierten Tag nach Transfektion bei über 90 %. (siehe Abbildung 22)



**Abbildung 22: Transfektionsergebnis mit der SF Lösung.** (a) Eine Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme am ersten Tag nach Transfektion, Maßstabsbalken 100 µm. (b und c) Durchflusszytometrische Analyse am ersten Tag nach Transfektion. (b) Auswahl der LCL-Zellen. (c) Darstellung der Durchflusszytometrie-Daten im Streudiagramm. Y-Achse: Färbung toter Zellen mittels TO-PRO®-3 (Q1+Q2), X-Achse: sGFP-Expression. Die Aufnahme vom Fluoreszenzmikroskop zeigt starke sGFP-Expression in den Zellen. Bei der Auswertung der Durchflusszytometrie mittels Streudiagramm bestätigte sich dieses Bild, knapp 80 % der Zellen waren sGFP<sup>+</sup>.

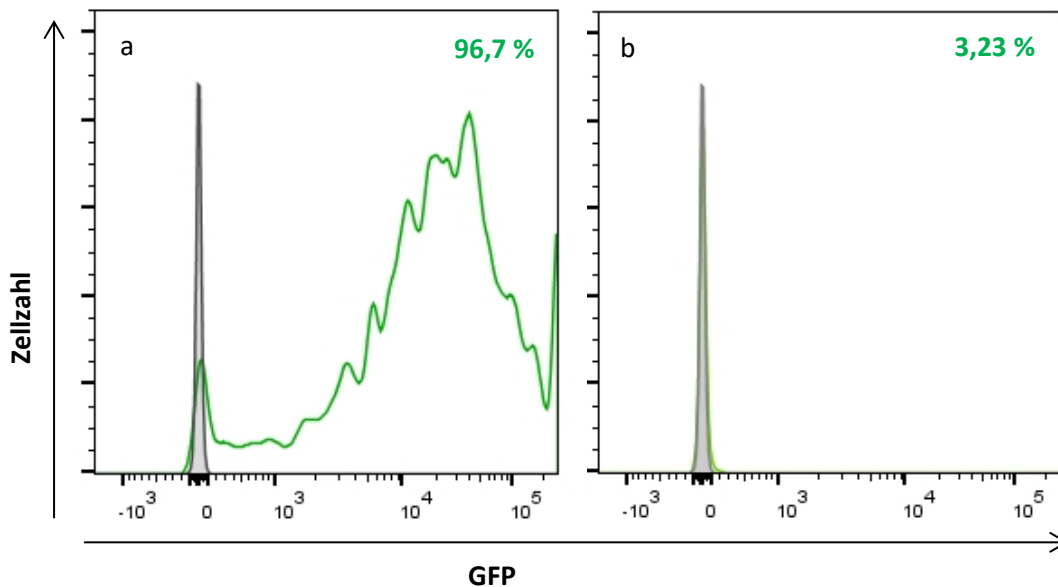
### 3.2.2.1.2.2 sGFP-Expression in LCL-Zellen nach Transfektion mittels RSV bzw. ptt5 Vektor

Um zu testen ob es Unterschiede in der Proteinexpression nach Transfektion von LCL-Zellen gibt, abhängig davon in welchem Vektor das zu exprimierende Protein vorliegt, wurde die sGFP-Expression nach paralleler Transfektion von sGFP im RSV und ptt5 Vektor verglichen.

Hierfür wurde der Klon 17490 mit jeweils 2 µg der entsprechenden Plasmide transfiziert. Bereits nach etwa 24 Stunden zeigte sich unter dem Fluoreszenzmikroskop, dass die Expression von sGFP nach Transfektion mit dem ptt5 Vektor wesentlich besser war.

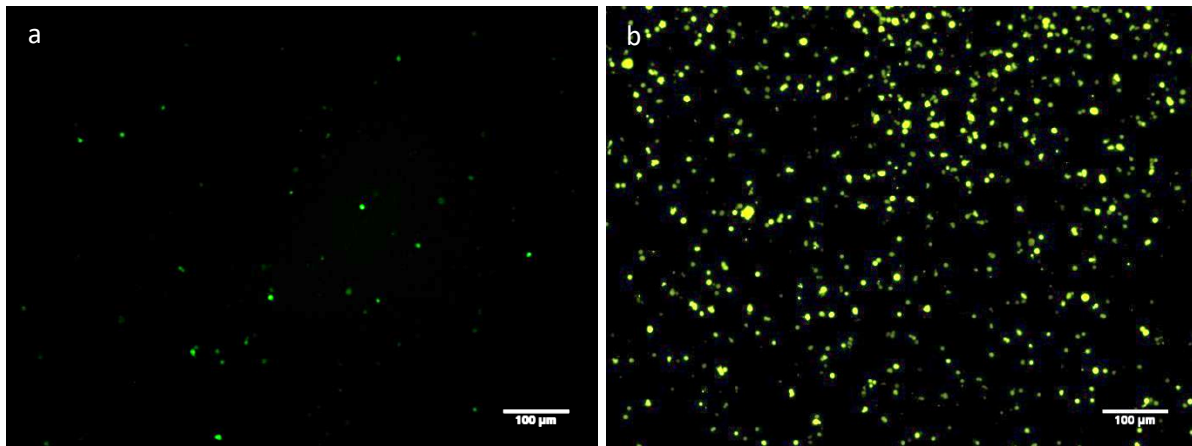
Auch am 2. Tag nach Transfektion wurde die Expression untersucht. Zusätzlich zur mikroskopischen Betrachtung der Zellen wurde eine Durchflusszytometrie durchgeführt. Die Färbung von toten Zellen erfolgte mittels TO-PRO®-3.

Hier zeigte sich eine sGFP-Expression bei 97 % der mit ptt5 sGFP transfizierten analysierten lebenden Zellen und nur bei 3,2 % der mit RSV sGFP transfizierten ausgewählten Zellen.



**Abbildung 23: Durchflusszytometrische Analyse der Transfektion von ptt5 sGFP sowie RSV sGFP.** sGFP-Expression in (a) mit ptt5 sGFP transfizierten und (b) mit RSV sGFP transfizierten Zellpopulationen jeweils in Relation zur NC (graue Kurve). X-Achse: sGFP-Expression, Y-Achse: Zellzahl. In (a) und (b) ist zu erkennen, dass mit ptt5 transfizierte analysierte Zellen zu fast 97 % sGFP exprimierten, wohingegen es beim RSV Vektor nur etwa 3 % waren. Tote Zellen wurden aus der weiteren Analyse ausgeschlossen.

Somit ist der ptt5 Vektor klar besser geeignet für die Transfektion von LCL-Zellen. Das mikroskopische Korrelat dieses Ergebnisses ist in Abbildung 24 zu sehen.



**Abbildung 24: Vergleich der Transfektionseffizienz des RSV Vektors mit der des ptt5 Vektors anhand der sGFP-Expression.** (a) Zellprobe transfiziert mit RSV sGFP, (b) Zellprobe transfiziert mit ptt5 sGFP (bei etwa vergleichbarer Zelldichte). Zu sehen ist eine deutlich erhöhte sGFP-Expression in der mit ptt5 sGFP transfizierten Probe. Maßstabsbalken 100 µm.

### 3.2.2.2 LCL-Zellen als antigenpräsentierende Zellen

#### 3.2.2.2.1 Suche nach endogener Aktivierung

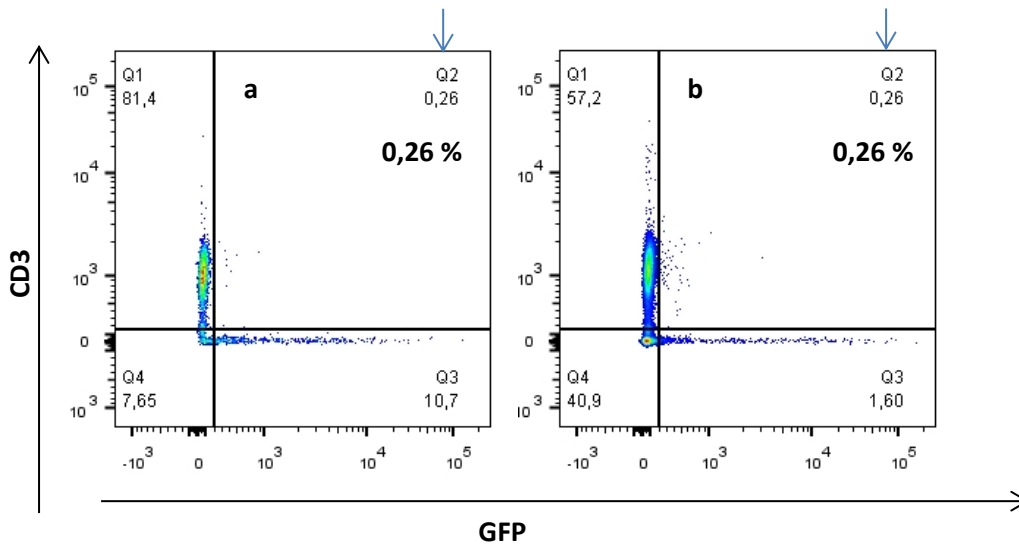
In der ersten Reihe dieser Versuche wurden die untransfizierten LCL-Zelllinien wie in den Methoden beschrieben mit IP2 T-Hybridomzellen in Kokultur gesetzt. (siehe 2.3.7.2.1.1)

Durch die verschiedenen exprimierten HLA-Moleküle der LCL-Zelllinien wurde das gesamte Spektrum der IP2 HLA-Moleküle für das Screening abgedeckt. Das Ziel war zu testen, ob Antigene aus dem normalen Zellstoffwechsel oder aber auch EBV-Antigene die T-Hybridome aktivieren können.

Der Versuch wurde insgesamt zwei Mal durchgeführt. Die Kokultur wurde beide Male nach 16 Stunden ausgewertet, indem der Überstand beim ersten Mal für einen IL-2 ELISA verwendet wurde und die Zellen zusätzlich beide Male mittels Durchflusszytometrie analysiert wurden.

Die CD3-Aktivierbarkeit der T-Hybridome als Positivkontrolle lag zu diesem Zeitpunkt bei etwa 80 % und 96 % der T-Hybridome wurden durch Färbung mit dem CD3-Antikörper erfasst. Aktivierte T-Hybridome aus den Kokulturen mit LCL-Zellen wären GFP<sup>+</sup> und CD3<sup>+</sup>, da sie bei Aktivierung sGFP exprimieren und mittels eines APC-gekoppelten CD3-Ak angefärbt wurden, um sie von den LCL-Zellen zu unterscheiden. In Abbildung 25 werden exemplarisch zwei Streudiagramme der durchflusszytometrischen Analyse der Kokulturen des zweiten Termins dargestellt.





**Abbildung 25: Durchflusszytometrische Analyse zweier Kokulturen von LCL-Zellen mit T-Hybridomen.** X-Achse: GFP-Expression, Y-Achse: CD3 Expression. (a) Kokultur mit LCL-Zelllinie KK, (b) Kokultur mit LCL-Zelllinie JM. Der Anteil von GFP<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup> Zellen (in Q2, siehe blaue Pfeile) blieb unter 1 %.

In der durchflusszytometrischen Analyse aller Kokulturen zeigte sich keine eindeutig über die Spontanaktivierung hinausgehende Aktivierung der T-Hybridome, die sich durch die Färbung mit einem APC-gekoppelten CD3-AK FITC<sup>+</sup>/APC<sup>+</sup> bzw. GFP<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup> dargestellt hätten. Diese Population an Zellen blieb jedoch in allen Kokulturen unter 1 %.

Die Analyse der zusätzlichen Durchführung hatte ebenfalls keine Aktivierung erkennen lassen. Hier wurde zudem ein ELISA durchgeführt, der jedoch außer in der CD3-Aktivierung ebenfalls keine relevante IL-2 Produktion nachweisen konnte.

Es zeigte sich zusammenfassend also weder im ELISA noch in der durchgeführten Durchflusszytometrie eine über das zu erwartende Maß an Spontanaktivierung hinausgehende Aktivierung der T-Hybridome in den Kokulturen mit untransfizierten LCL-Zellen.

### 3.2.2.2.2 CSRP2 und $\alpha_1$ -GABA<sub>A</sub>-Rezeptor

Als Erweiterung des oben beschriebenen Ansatzes wurden die LCL-Zellen mit RSV GABA und ptt5 CSRP2 transfiziert und später erneut mit ptt5 GABA und ptt5 CSRP2, da wie unter 3.2.2.1.2.2 festgestellt, der ptt5 Vektor eine wesentlich bessere Proteinexpression nach Transfektion im direkten Vergleich mit dem RSV Vektor erzielt hatte.

Die Auswahl der beiden transfizierten Peptide geschah durch Vorkenntnisse über IP2, wonach dessen Ak u. a. die  $\alpha_1$ -GABA<sub>A</sub>-Rezeptor Untereinheit erkannten und auch mit CSRP2 reagierten. Die T-Hybridome wurden hierfür wie in den Methoden beschrieben mit den transfizierten Zellen zum Zeitpunkt 28 und 52 h nach Transfektion in Kokultur gesetzt, beim zweiten Mal erst nach etwa 52 und 76 h.

Es war in diesem Experiment zu keinem der vier Analysezeitpunkte und mit keinem transfizierten Plasmid eine Aktivierung über das zu erwartende Maß an Spontanaktivierung nachweisbar.

Die CD3-Aktivierung war sowohl unter dem Fluoreszenzmikroskop als auch in den durchflusszytometrischen Analysen eindeutig positiv (80 % Aktivierung) und die sGFP-Kontroll-Transfektionen waren ebenfalls erfolgreich, mit sGFP-Expressionsraten um 80 %, sodass davon

ausgegangen werden konnte, dass die Zellen auch CSRP2 und die  $\alpha_1$ -GABA<sub>A</sub>-Rezeptor Untereinheit exprimierten. Durch die Färbung mit dem APC gelabelten CD3-Ak wurden 98 % der T-Hybridome erfasst. Isotyp-Kontrollen zeigten keine unspezifische Bindung.

Auch in den für alle vier Analysezeitpunkte durchgeführten ELISAs konnte zu keinem Zeitpunkt eine über Hintergrundrauschen hinausgehende IL2-Produktion nachgewiesen werden, bei gleichzeitig eindeutig positiver CD3-Aktivierung.

### **3.2.2.3 COS-7 Zellen als antigenpräsentierende Zellen**

#### **3.2.2.3.1 COS-7 Zellen mit PECP-Bibliotheken (N24 und N27)**

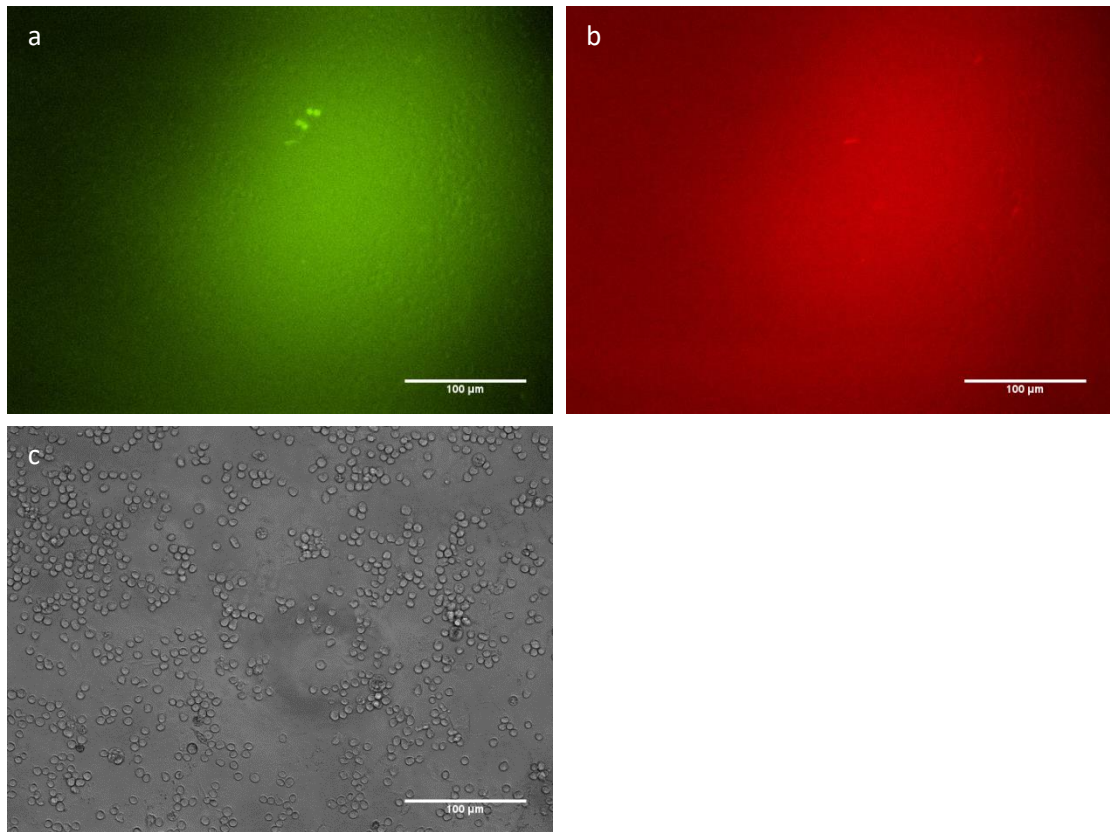
Wie unter 2.3.7.2.2 beschrieben, konnten die T-Hybridomzellen auch mit transfizierten COS-7 Zellen in Kokultur gesetzt werden und dann auf Aktivierung (entsprechend einer sGFP-Expression) unter dem Fluoreszenzmikroskop überprüft werden.

Transfiziert wurden die COS-7 Zellen dabei in der Regel mit einer Kombination der HLA kodierenden Plasmide von IP2, z. B. den beiden HLA-A Typen (HLA-A\*02:01 und A\*23:01) zusammen, HLA-B\*35:01 und B\*44:03 oder HLA-C\*04:01 und C\*16:01 jeweils zusammen. Es bestand auch die Möglichkeit COS-7 Zellen mit einzelnen HLA-Molekülen von IP2 von besonderem Interesse zu transfizieren. Von HLA-C\*04:01 und HLA-A\*02:01 war entsprechend der Vorarbeiten von Labormitarbeitern (A. Plappert) eine höhere Erfolgchance zu erwarten. Zu den HLA kodierenden Plasmiden wurde eine PECP-Bibliothek (N24 oder N27) transfiziert.

Die Beurteilung einer Probe erfolgte im Vergleich zur entsprechenden Negativkontrolle. Als Transfektionskontrolle wurde bei jedem Versuch eine sGFP-Transfektion von COS-7 Zellen mitgeführt und als Kontrolle der Aktivierbarkeit und der Spontanaktivierung der T-Hybridome wurden eine CD3-Aktivierung und Negativkontrolle (T-Hybridome ohne Zusätze) angesetzt.

Die Platten mit den Kokulturen wurden im grünen Fluoreszenzkanal gescreent auf der Suche nach Clustern (siehe Abbildung 26) aktivierter T-Hybridome, d. h. für diese Arbeit Gruppen aktivierter T-Hybridome von größer oder gleich drei Zellen.

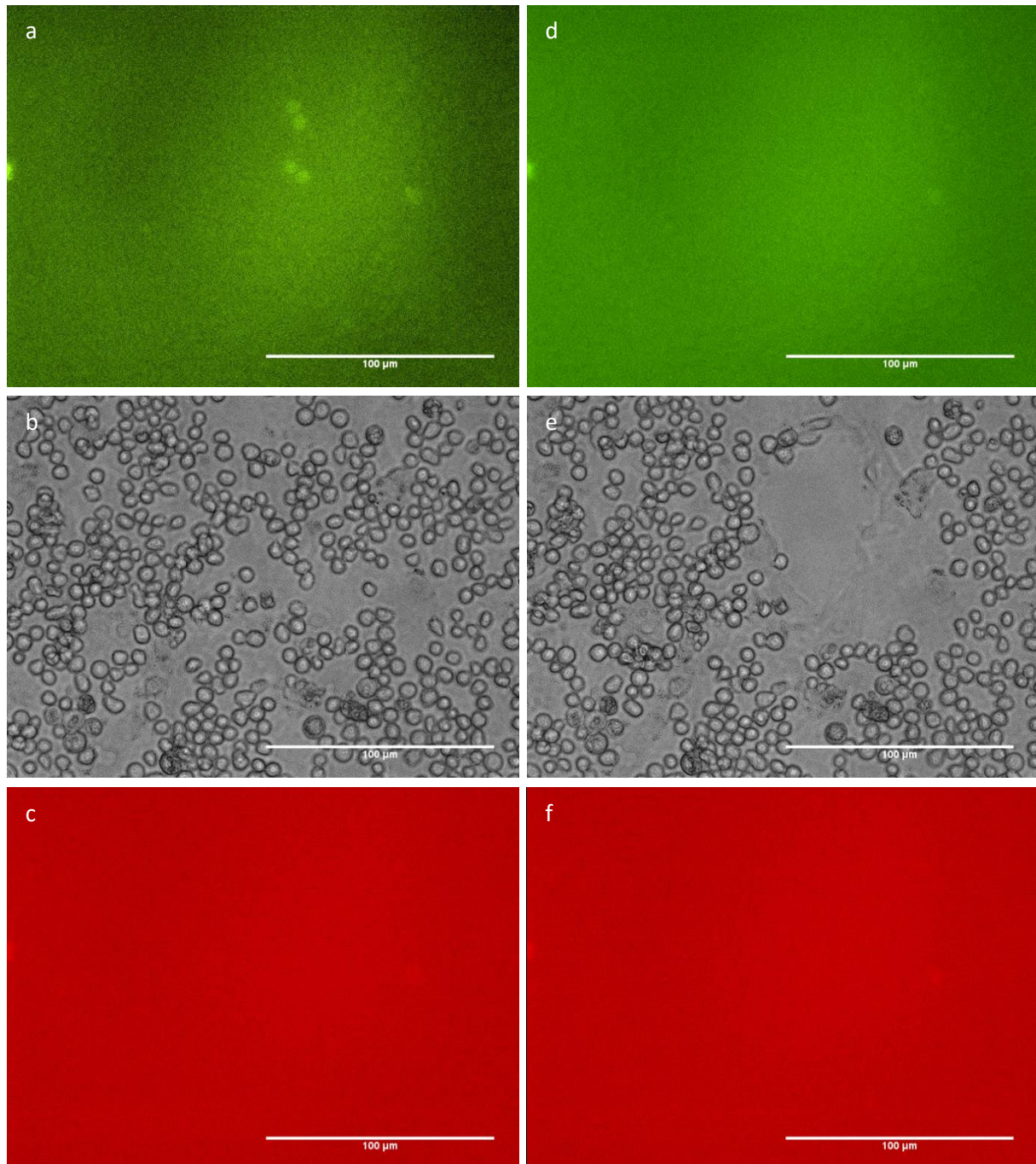




**Abbildung 26: Darstellung eines 4er Clusters.** (a) grüner Fluoreszenzkanal (GFP-Kanal), (b) roter Fluoreszenzkanal (Cy3-Kanal), (c) Durchlichtkanal. (a) Zu sehen ist ein 4er Cluster, das sich im GFP-Kanal deutlich darstellt. (b) Mittels des Cy3-Kanals kann ausgeschlossen werden, dass es sich bei diesem Cluster um Autofluoreszenz handelt. (c) Der Durchlichtkanal wird verwendet, um zu prüfen, dass die aktivierten T-Hybridome fest auf den APZ sitzen. Maßstabsbalken 100 µm.

Auf dem Cy3-Kanal wurde untersucht, ob es sich um Autofluoreszenz handelte, leichtes Rütteln am Mikroskop zeigte, ob die T-Hybridome fest an den antigenpräsentierenden Zellen hafteten. Nur dann war die Wahrscheinlichkeit groß, durch Isolierung der unter ihnen liegenden APZ, die „richtige“ APZ mit dem aktivierenden Plasmid zu isolieren.

Erfüllten die Cluster alle erforderlichen Bedingungen, so wurden die darunterliegenden APZ wie in Abbildung 27 demonstriert mit einer Glaskapillare isoliert.



**Abbildung 27: Darstellung eines 4er Clusters (a, b, c) vor und (d, e, f) nach der Isolierung der APZ mittels Glaskapillare.** (a) Im grünen Fluoreszenzkanal (GFP-Kanal) lässt sich deutlich ein 4er Cluster erkennen. (b, e) Im Durchlichtkanal ist gut sichtbar, dass die unter den aktivierten T-Hybridomen liegenden COS-Zellen mittels Kapillare isoliert wurden. (c, f) Der rote Fluoreszenzkanal (Cy3-Kanal) diente dem Ausschluss von Autofluoreszenz. Maßstabsbalken 100 µm.

### 3.2.2.3.1.1 Erste Runde Isolierung von APZ

Es zeigten sich bei der Untersuchung der Kokulturen Cluster für beide getesteten Bibliotheken, N24 und N27, über alle HLA-Moleküle hinweg in vergleichbarer Frequenz und Größe. Die darunter liegenden COS-7 Zellen wurden isoliert und wie beschrieben (siehe 2.5.4.6-2.5.4.10) weiter verarbeitet.

Insgesamt wurden APZ an 10 Stellen unter Clustern aktivierter T-Hybridome isoliert. Davon entfielen 5 Cluster auf eine Transfektion mit der N27 Bibliothek und 5 auf eine Transfektion mit der N24 Bibliothek.

**Tabelle 19: Primär isolierte APZ nach HLA-Molekül und Art der PECP-Bibliothek sowie jeweils gescreente Fläche und Cluster pro cm<sup>2</sup>**

Transfizierte HLA-Moleküle	Probe/Bibliothek	Anzahl von Clustern, unter denen APZ isoliert wurden, und Größe der entsprechenden Cluster	Anzahl gescreenter Platten à 9,6 cm <sup>2</sup> und gescreente Gesamtfläche in cm <sup>2</sup>	Cluster pro cm <sup>2</sup>
A*02:01 und A*23:01	N24	2 (3-4er Cluster)	1 - 9,6	0,21
A*02:01 und A*23:01	N27	1 (4er Cluster)	4 - 38,4	0,03
A*02:01	N24	-	1 - 9,6	0
A*02:01	N27	-	1 - 9,6	0
B*35:01 und B*44:03	N24	2 (3er Cluster)	1 - 9,6	0,21
B*35:01 und B*44:03	N27	2 (3-4er Cluster)	4 - 38,4	0,05
C*04:01 und C*16:01	N24	1 (3er Cluster)	1 - 9,6	0,10
C*04:01 und C*16:01	N27	1 (3er Cluster)	4 - 38,4	0,03
C*04:01	N24	-	1 - 9,6	0
C*04:01	N27	1 (4er Cluster)	1 - 9,6	0,10

Wie in Tabelle 19 zu sehen ist, zeigte sich bei der N24 Bibliothek, vor allem mit Hinblick auf die kleinere gescreente Fläche, eine höhere Frequenz an Clustern. Die Clusteranzahl für N24 liegt durchschnittlich über alle getesteten HLA-Kombinationen hinweg bei 0,10 pro cm<sup>2</sup>, für die N27 Bibliothek bei 0,04. Es war jedoch nicht möglich die HLA-Restriktion des Klons IP2-8S1 an dieser Stelle zu bestimmen.

Teilweise traten mehr Cluster auf, als APZ isoliert werden konnten, da die Hybridome nicht fest auf den darunterliegenden APZ saßen. Die Anzahl derartiger Cluster war für HLA-C\*04:01 und C\*16:01 am höchsten.

Mit den unter den Clustern liegenden COS-7 Zellen wurde nach der Isolierung wie in 2.5.4.6-2.5.4.10 beschrieben weiterverarbeitet. Zusammengefasst bedeutet das, dass die aus den APZ isolierten und per PCR vervielfältigten Bibliotheks-Inserts zunächst wieder in den Vektor pcDNA<sup>TM</sup> 3.1 D/V5-His-TOPO® Vektor ligiert und in E. coli transformiert wurden. Dann wurden sie per Mini-Prep isoliert und nach Kontrolle der Sequenz wieder in COS-7 Zellen transfiziert und für eine Reaktivierung verwendet.

### 3.2.2.3.1.2 Reaktivierung und zweite Runde Isolierung

Mit diesen oben erwähnten transfizierten COS-7 Zellen wurde dann jeweils wieder eine Kokultur angesetzt. Vor der zweiten Transfektion wurde per Sequenzierung überprüft, dass sich ein entsprechendes Bibliotheks-Insert im Vektor befand. In dieser Weise wurden alle positiv geprüften primär isolierten APZ weiterverwendet und APZ unter als Reaktivierung auftretenden Clustern von T-Hybridomen erneut isoliert (= zweite Runde Isolierung).

In dieser zweiten Runde ging es darum, nach einer Reaktivierung mit Anreicherung der Aktivierung zu suchen. Das bedeutet, dass nun mehr Cluster auftreten sollten als in der ersten Runde, da das aktivierende Peptid nun in einer höheren Dichte vorkommen sollte, als bei der Transfektion mit der ursprünglichen PECP-Bibliothek.

Aus den Reaktivierungsversuchen entstand ein Pool aus insgesamt 38 Proben. Diese Proben wurden erneut wie oben zusammengefasst weiterverarbeitet und abschließend die Sequenz des ligierten Produktes überprüft. Proben, die diese Überprüfung bestanden, wurden wie unter 3.2.2.3.1.3 beschrieben weiterverwendet.

### 3.2.2.3.1.3 Reaktivierung in gepoolten Proben

Auch wenn sich in fast allen Proben eine Reaktivierung fand, unter der wieder die APZ isoliert wurden, konnte keine eindeutige Anreicherung für eine der primär isolierten Proben bei der zweiten Transfektion mit Sicherheit bestätigt werden. Daher wurde entschieden, die Proben aus der Reaktivierung nach HLA-Merkmal gepoolt zu mischen und als Pools zur Retransfektion zu nutzen. Eine Zusammenstellung der zur Retransfektion verwendeten Pools findet sich in Tabelle 20.

**Tabelle 20: Zusammenstellung der zur Retransfektion verwendeten Pools**

Transfizierte Merkmale	HLA-Merkmale	Anzahl der Proben im Pool
HLA-A*02:01 und A*23:01		5
HLA-B*35:01 und B*44:03		5
HLA-C*04:01 und C*16:01		Pool 1: 4 Pool 2: 4
HLA-C*04:01		5

Für Pools aus 5 Proben wurden je Probe 200 ng, bei 4 Proben je 250 ng transfiziert, insgesamt also 1 µg Probe. Dazu wurde jeweils 1 µg der entsprechenden HLA-Moleküle/des entsprechenden HLA-Moleküls transfiziert.

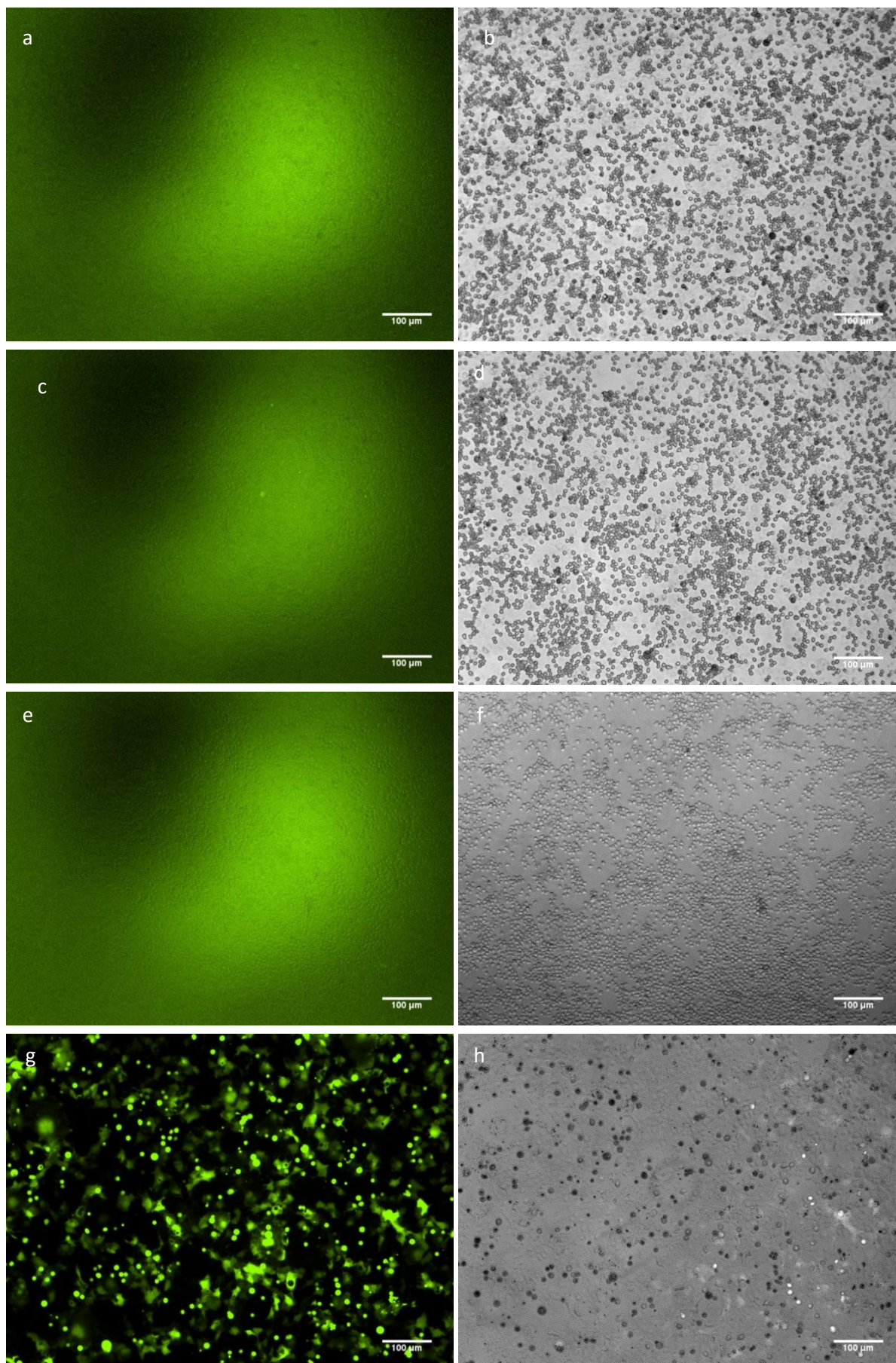
Bei der Überprüfung der Kokulturen der mit gepoolten Proben transfizierten COS-7 Zellen konnte keine weitere über die Spontanaktivierung hinausgehende Aktivierung festgestellt werden und es konnten keine APZ unter Clustern isoliert werden.

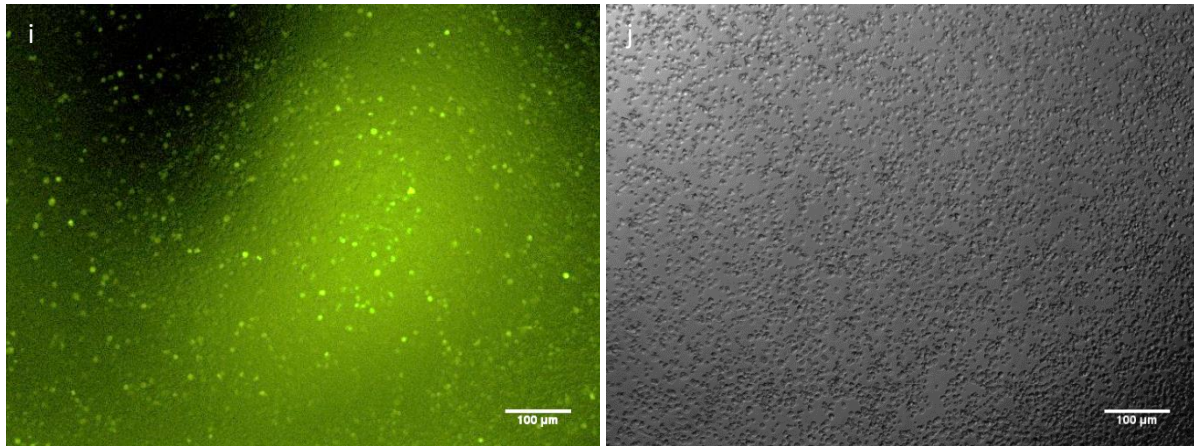
### 3.2.2.3.2 COS-7 Zellen mit Kandidatenpeptiden

Als weiterer Ansatz zur Aufdeckung des Zielantigens von IP2 wurden COS-7 Zellen mit drei Kandidatenpeptiden generiert aus CSRP2 (siehe 2.3.7.2.2.4) transfiziert und für eine Kokultur mit Hybridomen verwendet. Die Kandidatenpeptide waren passend zu den Bindungsmotiven von HLA-C\*04:01 und HLA-A\*02:01 und wurden zusammen mit den jeweiligen HLA kodierenden Plasmiden transfiziert. 48 und 72 Stunden nach Transfektion wurden die Kokulturen auf Aktivierung untersucht. In Abbildung 28 sind exemplarisch Aufnahmen vom Screening-Zeitpunkt 48 Stunden nach Transfektion zu finden.

Hier wäre im Gegensatz zum Screening mit einer PECP-Bibliothek eine weitaus höhere Frequenz an Aktivierung zu erwarten gewesen, da lediglich je ein Peptid alleine transfiziert wurde. Somit sollte es auf einem Großteil der Zellen exprimiert werden, zumal es nicht durch nicht aktivierende Peptide verdünnt wäre. Zu beiden Zeitpunkten konnte allerdings unter dem Fluoreszenzmikroskop keine über das Maß der bekannten Spontanaktivierung hinausgehende Aktivierung der T-Hybridome im Vergleich mit entsprechenden Negativkontrollen entdeckt werden. Die CD3-Aktivierung und eine Transfektionskontrolle mit sGFP Transfektanten waren jedoch erfolgreich.







**Abbildung 28: Darstellung des Screeningzeitpunktes 48 h nach Transfektion der Kandidaten.** Die Kokulturen nach Transfektion der Kandidaten sind jeweils im GFP- und Durchlichtkanal dargestellt. (a und b) Kandidat 1 mit HLA-A\*02:01; (c und d) Kandidat 2 mit HLA-C\*04:01; (e und f) Kandidat 3 mit HLA-C\*04:01; (g und h) Transfektionskontrolle: sGFP in COS-7 Zellen; (i und j) Positivkontrolle: CD3-Aktivierung des für die Kokulturen verwendeten Klons 11. In den Kokulturen mit den Kandidaten ließ sich keine Aktivierung über das Maß der Spontanaktivierung hinaus erkennen. In der Transfektionskontrolle mit sGFP sind viele sGFP<sup>+</sup> COS-7 Zellen sichtbar und in der CD3-Aktivierung bestätigte sich die Aktivierbarkeit der verwendeten T-Hybridome. Maßstabsbalken 100 µm.



## 4. Diskussion

### 4.1 Autoimmunerkrankung MS - Rolle der Unterscheidung von Aggressoren, Regulatoren und unbeteiligten Zuschauern

Eine Vielzahl von Zellen sowohl des angeborenen als auch des adaptiven Immunsystems sind am Verlauf der Erkrankung Multiple Sklerose beteiligt. (Dendrou et al., 2015) Die Fragen, was die Erkrankung auslöst, sowie welche Zellen Aggressoren sind, welche nur unbeteiligte Zuschauer, und welche Zellen eventuell sogar Regulatoren sind, sind noch immer nicht vollständig beantwortet. (Hohlfeld et al., 2016) Somit hat es weiterhin höchste Priorität, neue Erkenntnisse über Subpopulationen von beteiligten Zellen zu sammeln, um am Ende das Gesamtzusammenspiel der Erkrankung zu durchschauen, und gezielt kausale Therapien weiter entwickeln zu können. Dadurch könnte der Verlauf der Erkrankung nicht nur modifiziert, sondern im besten Fall aufgehalten werden und die Krankheit sogar geheilt werden.

Im Rahmen dieses Vorhabens wurden in der vorliegenden Dissertation die Expressionsmuster ausgewählter Gene in MS-Läsionen eines Patienten untersucht, sowie zwei  $CD8\alpha^+$  Zellpopulationen anhand der Expression derselben Gene in LMD-isolierten Zellen charakterisiert. Zusätzlich wurden die zwei Zellpopulationen mittels NGS untersucht. Die hierbei erreichten Ergebnisse und mögliche Implikationen für das Verständnis der Multiplen Sklerose werden in den folgenden Abschnitten diskutiert.

#### 4.1.1 $CD94^+$ - $CD8\alpha^+$ Zellen im Vergleich mit $CD8\alpha^+$ - $CD94^-$ Zellen

$CD94$  bildet Heterodimere mit verschiedenen NK-Zellrezeptoren. Beim Vergleich des Transkriptoms der  $CD94^+$ - $CD8\alpha^+$  Zellen mit  $CD8\alpha^+$ - $CD94^-$  Zellen fand sich, entsprechend der bekannten Koppelung von  $CD94$  mit NKG2-Produkten, NKG2A/B auf Transkriptomlevel in dem  $CD94^+$ - $CD8\alpha^+$  Pool. Bei  $CD94^-$ - $CD8\alpha^+$  Zellen konnten die NKG2-Moleküle mit diesem Ansatz nicht nachgewiesen werden.

Somit konnten nur die inhibitorischen Isoforme NKG2A/B in RNA aus  $CD94^+$ - $CD8\alpha^+$  Zellen nachgewiesen werden. Dies stimmt mit immunhistochemischen Ergebnissen von K. Held und M. Konjevic überein, die in denselben Gebieten, aus denen die Zellen isoliert wurden, viele  $CD94^+$ -NKG2A<sup>+</sup> Zellen unter den  $CD8\alpha^+$  Zellen gesehen hatten. (persönliche Kommunikation) Somit lieferte der Ansatz die Bestätigung der Immunhistochemie auf Transkriptomebene.

Um welche Zellart es sich bei den beiden Pools handelt, konnte durch NGS Untersuchungen weiter eingegrenzt werden. (siehe 4.1.3) Die Rolle der  $CD94^+$ - $CD8\alpha^+$  Zellen in MS-Läsionen wird in 4.1.4-4.1.5 diskutiert.

#### 4.1.2 Primeroptimierung

Die wesentlichen Ergebnisse des durchgeführten Primer-Tests an Tonsillen RNA (siehe 3.1.3.1) waren, dass es möglich ist, den inhibitorischen Subtyp NKG2A/B von den als aktivierend angesehenen Varianten NKG2C, NKG2E, NKG2H und NKG2D zu unterscheiden. Hierbei wurde mit dem Primer für NKG2C jedoch ebenfalls NKG2E/H nachgewiesen.

Auch die Primer für  $CD3\epsilon$  als T-Zellmarker und interessierende Zytokine wie IL-10, Interferon  $\gamma$  sowie zusätzlich  $CD94$  und HLA-E erwiesen sich als effizient.

Das erwähnte Problem, dass sich das Produkt der PCR mit den Primern für NKG2C in der Sequenzierung einmal als NKG2E/H und in den Zellpools als NKG2A/B herausstellte, lässt sich zum Teil dadurch erklären, dass zum einen die Sequenzen dieser Unterformen zum Großteil sehr ähnlich sind. So gibt es Abschnitte mit Sequenzübereinstimmungen bis über 90 %. (Houchins et al., 1991; Sullivan et al., 2007) Zum anderen banden die Primer, wie auch von Anfang an bekannt, teilweise mehrere Produkte.

Der äußere *forward* Primer von NKG2C bindet statt nur an NKG2C u. a. auch an NKG2A und der innere *forward* Primer für die *semi-nested* PCR an NKG2C, NKG2E und NKG2H zugleich. Hinzu kommt, dass der Unterschied zwischen den Sequenzen anderer Subtypen und den jeweiligen Primersequenzen wie bereits erwähnt teils nur aus wenigen Nukleotiden besteht. Somit ist durchaus vorstellbar, dass die Primer selbst dann an andere Genprodukte binden, wenn die Sequenz in ein paar wenigen Nukleotiden verschieden ist, und so eine Mutagenese einzelner Nukleotide auslösen. Auf diese Art kann es sein, dass nicht das gewünschte Produkt NKG2C, sondern eine der anderen Formen in der PCR hiermit vervielfältigt wird.

Die Ergebnisse der Experimente machen somit klar, dass für weitere Experimente optimierte Primer v. a. für NKG2C entwickelt und verwendet werden müssten.

### 4.1.3 NGS Ergebnisse der Zellpools und Folgerungen

Dank der parallelen Analyse der isolierten RNA aus den beiden unterschiedlichen Zellpools durch E. Beltran mittels NGS in unserem Labor, war feststellbar, dass im Transkriptom beider Pools (also sowohl in CD94<sup>+</sup>-CD8α<sup>+</sup> als auch CD94<sup>-</sup>-CD8α<sup>+</sup> Zellen) die konstante Domäne der α- und der β-Kette des TZR nachweisbar war. Somit handelt es sich bei den isolierten Zellen um eine Population von T-Zellen und nicht um andere Zellen, die ebenfalls CD8 exprimieren können, wie NK-Zellen oder Monozyten. Dies ist eine Bestätigung der immunhistochemischen Ergebnisse von M. Konjevic, die bei diesen Zellen auch CD3 als T-Zellmarker angefärbt hatte. (siehe 1.1.4.1.2.2)

Es gibt bereits Studien, die berichten, dass eben solche CD94<sup>+</sup>-NKG2<sup>+</sup>-α<sup>+</sup>/β<sup>+</sup>-CD8<sup>+</sup>-T-Zellen oligoklonale Populationen sind, die einen Effektor-Gedächtnis-Typ aufweisen. (Braud et al., 2003; McMahon and Raulet, 2001)

Um zu bestimmen, um welche Subpopulation von T-Zellen es sich in unseren Proben handelt, wäre es sinnvoll, die variablen Regionen der TZR zu untersuchen, um Aussagen über Poly- oder Oligoklonalität zu treffen und Rückschlüsse auf die erkannten Antigene zu ziehen. Durch die Analyse der variablen Ketten könnten auch NK-T-Zellen anhand TZR α-Ketten bzw. β-Ketten ausgeschlossen werden, da sich hier nur bestimmte Unterformen finden sollten. (Godfrey et al., 2010) NK-T-Zellen sind natürliche Suppressoren, die regulatorisch in der MS tätig sind, und deren verminderte Funktionsfähigkeit eine Rolle in der EAE spielt. (Correale and Villa, 2008) Wie unter 1.1.3 beschrieben erkennen sie u. a. Lipide über CD1d.

Um die variablen Ketten in derartigen Pools zu analysieren, wäre jedoch eine noch höhere Sensitivität vonnöten, da diese bei poly- und oligoklonalen Populationen jeweils eine geringere Frequenz haben, als die für alle TCR gleiche konstante Region. Dies ist ein Problem, das in zukünftigen Experimenten Beachtung finden sollte.



#### 4.1.4 Genexpression in verschiedenen Hirnregionen von Patient A und Folgerungen für die Rolle von CD94<sup>+</sup>-CD8α<sup>+</sup>-T-Zellen

In dieser Arbeit wurden RNA-Proben aus verschiedenen Biopsie-Blöcken des Patienten A auf die Expression ausgewählter Gene untersucht. Hierunter waren zwei Proben aus der Region 10A und eine Probe aus der Region 12b. Bei Betrachtung der Analyseergebnisse der verschiedenen untersuchten MS-Läsionen fallen einige Punkte ins Auge. Aus den Unterschieden in der Genexpression (zur Übersicht siehe Tabelle 17 unter 3.1.3.2.1) können hypothetische Überlegungen angestellt werden.

Dabei gilt es jedoch die potentielle Degradierung der Proben trotz der Aufbewahrung der RNA bei -80 °C zu beachten, sowie die Lagerungsbedingungen in der Vergangenheit. Es muss besonders betont werden, dass die Probe dem Patienten A ursprünglich aus diagnostischen Beweggründen entnommen worden war, sodass nicht bekannt ist, wie viel Zeit bis zum Einfrieren für weitere Forschung verging. Auch wurden die Blöcke für die Herstellung der 10 µm-Hirnschnitte zum Teil bereits mehrfach auf Temperaturen von -20 °C erwärmt. (Backes, 2010) All dies könnte Einfluss auf die Qualität der Proben haben.

Das Vorkommen von HLA-E in Läsion 10A passt zu Ergebnissen, wonach HLA-E v. a. in aktiven MS-Läsionen hochreguliert ist und für die Interaktion zwischen CD4<sup>+</sup>-T-Zellen und möglicherweise regulatorischen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen von Bedeutung sein könnte. Als wichtige Komponente in der Aktivierung von regulatorisch tätigen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen könnte HLA-E einen schützenden Einfluss im Verlauf der Erkrankung ausüben. (Correale and Villa, 2008; Durrenberger et al., 2012; Li et al., 2001)

Insgesamt wurden in den Proben aus der Läsion in Region 10A sowohl aktivierende (z. B. NKG2E/H) als auch inhibierende Varianten (NKG2A/B) der NKG2-Transkripte nachgewiesen. Es gibt bereits Studien, die zeigen, dass im Falle einer gleichzeitigen Expression von NKG2A (inhibierend) und NKG2C (aktivierend) auf NK-Zellen die inhibitorische Wirkung von NKG2A im Vergleich mit NKG2C überwiegt. (Beziat et al., 2011; Braud et al., 2003) Dies ist wohl auch eine Folge von NKG2As höheren Affinität gegenüber HLA-E. (Kaiser et al., 2005; Vales-Gomez et al., 1999) NKG2A könnte mit seiner inhibitorischen Komponente die aktivierende Komponente von NKG2C abschwächen, was ebenfalls einen Einfluss auf Autoimmunität ausüben kann. (Beziat et al., 2011) Für NKG2A und NKG2E wurden jedoch gleiche Affinitäten gezeigt. (Kaiser et al., 2005) Wie genau die unterschiedlichen aktivierenden und hemmenden Signale in den Zellen integriert und verarbeitet werden, ist noch nicht vollständig geklärt. (Kaiser et al., 2005) Das inhibitorische Signal soll jedoch zumindest bei NK-Zellen, die beide Arten von Rezeptoren exprimieren, allgemein überwiegen. (Braud et al., 2003)

In der Läsion der Region 12b konnte kein inhibitorisches NKG2A/B nachgewiesen werden. Stattdessen wurde nur HLA-E zusammen mit NKG2F, einem Subtyp, der aktivierend auf NK-Zellaktivität wirken soll, festgestellt. (Huang et al., 2010; Kim et al., 2004)

Beim Vergleich der Ergebnisse der RNA Analyse aus den beiden Läsionen der Region 10A und 12b von Patient A lässt sich folglich feststellen, dass in Region 12b verglichen mit Region 10A keine inhibitorischen Vertreter der NKG2-Formen nachgewiesen werden konnten, sondern lediglich NKG2F. Zudem konnte zwar in beiden Gebieten HLA-E nachgewiesen werden, in Region 12b fehlt im Gegensatz zu Region 10A jedoch der Nachweis von CD94. (siehe Tabelle 17)

Die Funde in der Region 12b machen Sinn vor dem Hintergrund, dass NKG2F im Gegensatz zu den meisten anderen NKG2-Untertypen mit DAP 12 Heterodimere formt und nicht mit CD94. (Kim et al., 2004) Dem Molekül wird am ehesten eine aktivierende Wirkung zugesprochen, die Liganden sind jedoch noch nicht endgültig geklärt, sodass die genaue Bedeutung des Moleküls derzeit unklar ist. (Huang et al., 2010; Kim et al., 2004).

Dass das inhibitorische NKG2A/B in der Region 12b nicht nachweisbar ist, könnte zum einen methodische Gründe haben und sollte daher erneut verifiziert werden. Es könnte aber auch bedeuten, dass es in dieser Region ebenso wie CD94 nicht so stark exprimiert wird und daher mittels RNA Analyse nicht nachweisbar ist. In immunhistochemischen Untersuchungen von Kathrin Held gab es jedoch sowohl in Region 10A als auch Region 12b starke CD8<sup>+</sup>-Infiltrate, von denen große Teile CD94<sup>+</sup> und NKG2A<sup>+</sup> waren. (persönliche Kommunikation mit Kathrin Held) Somit kann aus dem Ergebnis der Transkriptomanalyse v. a. ein relatives Überwiegen von NKG2F auf Transkriptomebene gegenüber allen anderen NKG2-Formen in dieser Läsion geschlossen werden, da es als einziges nachgewiesen werden konnte. Für NKG2F gilt zudem, dass es wohl nur intrazellulär exprimiert wird, im Gegensatz zu den anderen NKG2-Unterformen. (Kim et al., 2004) Auch dies könnte eine Rolle gespielt haben.

Da die gesamte isoliert RNA aus den Hirnschnitten untersucht wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, dass möglicherweise verschiedene NKG2-exprimierende Zellen (u. a. NK-Zellen) einen Beitrag zu den beschriebenen Phänomenen beisteuern. In den untersuchten Regionen waren vor allem viele CD94<sup>+</sup>-CD8α<sup>+</sup> Zellen immunhistochemisch feststellbar, die in der Transkriptomanalyse NKG2A/B exprimieren. (siehe 4.1.1) Weil es sich bei diesen Zellen zudem um T-Zellen handeln soll (siehe 4.1.3), werden vorrangig diese CD94<sup>+</sup>-CD8α<sup>+</sup>-T-Zellen als Träger der NKG2-Moleküle in den folgenden Überlegungen betrachtet.

In den letzten Jahren gab es vermehrt Studien zu CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, die als Regulatoren der MS tätig sein könnten. (Baughman et al., 2011; Correale and Villa, 2008; Sinha et al., 2015; Sinha et al., 2014) Unter der Hypothese, dass die CD94<sup>+</sup>-CD8α<sup>+</sup>-T-Zellen in den untersuchten Läsionen zu den genannten Regulatoren gehören, wären diese Zellen in Region 12b möglicherweise in ihrer zytolytischen Funktion gegenüber von z. B. autoreaktiven CD4<sup>+</sup>-T-Zellen nicht derart eingeschränkt wie in der Läsion 10A. Sie wären nicht so stark durch inhibitorische NKG2-Moleküle gehemmt wie in anderen Läsionen mit nachgewiesener NKG2A/B Expression (wie Region 10A), sondern unter Umständen sogar durch NKG2F aktiviert. Dies könnte spekulativ mit einer besseren Eindämmung der Autoimmunität im Gebiet 12b einhergehen.

In Voruntersuchungen wurden sowohl der Block 10A als auch 12b als stark aktive Läsionen enthaltend beschrieben, wobei in Region 12b jedoch insgesamt weniger CD8<sup>+</sup> Zellen beobachtet wurden. (Backes, 2010) Zusätzlich ist die Läsion, aus der die Probe für Region 12b stammt, im direkten Vergleich wesentlich schwächer, als die stark ausgeprägte Läsion, aus der die Proben für Region 10A stammen. (persönliche Kommunikation mit M. Konjevic) Dies könnte zu oben geäußelter Hypothese zur Funktion der Zellen als regulatorische T-Zellen passen. Die Läsion in Region 12b könnte durch die stärker aktivierten regulatorischen T-Zellen besser unter Kontrolle gehalten werden, als die Läsion in Region 10A, mit den möglicherweise gehemmten NKG2A exprimierenden regulatorischen T-Zellen.

Es könnte spekuliert werden, dass dies darüber hinaus damit in Übereinstimmung stehen könnte, dass NKG2A erst im Verlauf nach Antigenerkennung durch den TZR hochreguliert wird. (Braud et al., 2003) Durch die Hochregulierung von NKG2A nach Antigenkontakt kommt es durch Hemmung der regulatorischen Zellen in der Folge zum Versagen der Kontrolle über die Autoimmunität, da NKG2A<sup>+</sup> Zellen verminderte regulatorischen Funktionen ausüben können. (Correale and Villa, 2008) Somit könnte es möglicherweise zu stark aktiven Läsionen wie in Region 10A im Rahmen von Exazerbationen der Erkrankung kommen.

Aus der Hochregulierung von NKG2A bei Antigenkontakt lässt sich zudem folgern, dass NKG2A<sup>+</sup> T-Zellen wahrscheinlich nicht nur unbeteiligte Zuschauer der Erkrankung sind.

#### **4.1.5 Zusammenfassende Bewertung der Ergebnisse und mögliche Rolle der untersuchten Zellen in der Erkrankung**

Anhand der Diskussion zu diesem Thema soll deutlich werden, wie vielfältig die Zusammenspiele und Rollen der verschiedenen Zellsorten sein können und wie es in der MS zu einer Störung der Immunregulation kommen könnte.

CD8<sup>+</sup> Zellen machen einen Großteil der Infiltrate bei MS aus. Doch die Rolle der einzelnen Zellen ist noch nicht vollständig verstanden. Somit ist es wichtig einzelne Subpopulationen zu untersuchen, wie auch die hier untersuchten CD94<sup>+</sup>-CD8α<sup>+</sup> Zellen. Die Frage, die hinter der Untersuchung des Transkriptoms von CD94<sup>+</sup>-CD8α<sup>+</sup> im Vergleich mit CD94<sup>-</sup>-CD8α<sup>+</sup> Zellen stand, war herauszufinden, welchen Einfluss diese Zellen auf den Verlauf der Erkrankung haben könnten.

Die vorhandene Literatur zu diesem Thema ist sehr umfangreich und spiegelt das Interesse an dieser Thematik wieder. Teils lassen sich widersprüchliche Forschungsergebnisse finden.

In ihren Untersuchungen konnten McMahon et al. bereits feststellen, dass die Expression von CD94/NKG2A als Aktivierungsmarker von T-Zellen bei Antigenkontakt gesehen werden kann, diese die Effektoraktivität der exprimierenden T-Zellen aber teils nicht inhibitorisch beeinflusst. (McMahon et al., 2002) In anderen Studien gab es hierzu abweichende Ergebnisse (Correale and Villa, 2008), daher wäre es denkbar, dass CD94/NKG2A nur einen Teil der Signalkette ausmacht, die schließlich nur unter der Erfüllung von bestimmten Bedingungen zur Hemmung von T-Zellen führt. (McMahon et al., 2002)

Es gibt auch Hinweise darauf, dass der Einfluss von NKG2A/CD94 abhängig von der vorliegenden Antigenkonzentration sein könnte. Bei niedrigeren Konzentrationen des Antigens war die Fähigkeit zur Lyse verbessert, wenn CD94-Ak eingesetzt wurde. (Noppen et al., 1998) Auch Carena et al. fanden heraus, dass das höchste Einflusspotential von NKG2A bei niedrigen Antigendosen vorliegt. (Carena et al., 1997)

NKG2A könnte somit in manchen Fällen dazu dienen, die Aktivierungsschwelle von T-Zellen nach oben zu setzen (Carena et al., 1997), um derart zu verhindern, dass T-Zellen von niedrigen Dosen aktiviert werden. Auf diese Weise könnte der Entstehung von Autoimmunerkrankungen durch autoreaktive T-Zellen entgegengewirkt werden.

Folglich sind zwei hypothetische Szenarien für die Rolle von T-Zellen mit NK-Rezeptoren (insbesondere NKG2A) denkbar, so wie es offenbar auch insgesamt für CD8<sup>+</sup>-T-Zellen zwei große verschiedene Rollen in der MS zu geben scheint. (siehe Abbildung 29) Die Rolle von unbeteiligten

Zuschauern scheint zudem durch den Zusammenhang der NKG2A-Expression mit Antigenkontakt unwahrscheinlich.

Zum einen könnten die T-Zellen direkte Aggressoren sein, die selbst gehemmt werden müssen, um Autoimmunität zu verhindern. Ist die NKG2A vermittelte Hemmung nicht ausreichend, kann es zu übermäßigen Immunreaktion und somit zur Entstehung von Autoimmunität kommen. (Braud et al., 2003; Noppen et al., 1998)

Zum anderen wäre es möglich, dass sie als Regulatoren tätig werden, wie oben bereits ausgeführt.

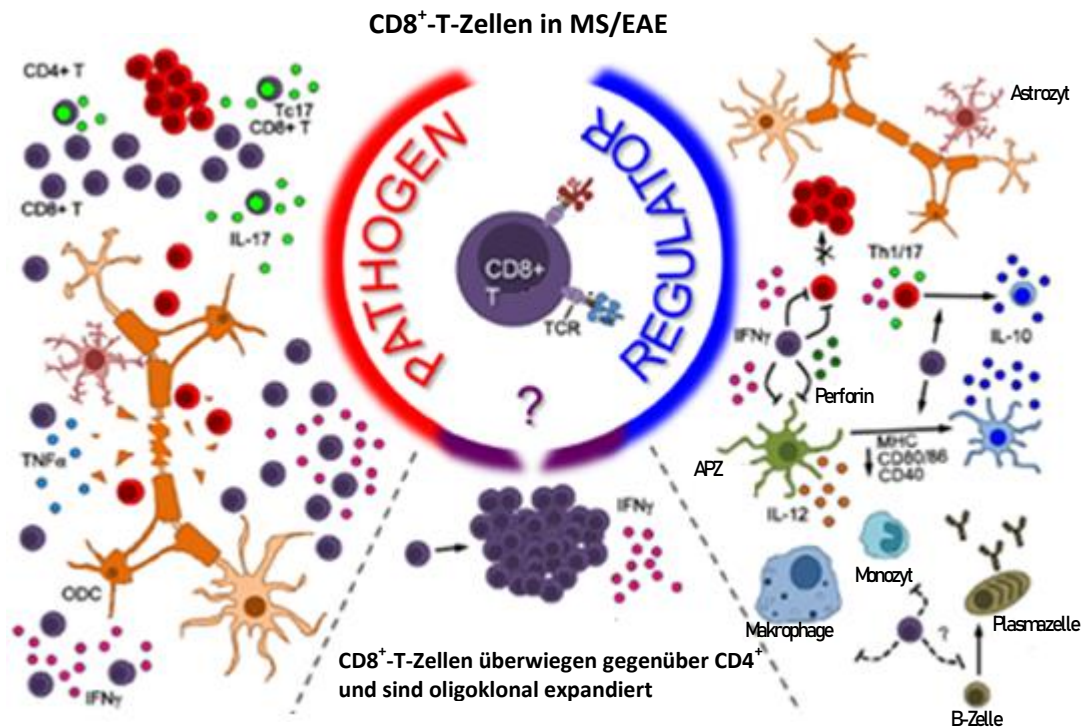
In letzter Zeit erhalten regulatorische Untergruppen von Zellen des Immunsystems mehr und mehr Aufmerksamkeit, da sie von großer Bedeutung für die periphere Toleranzerhaltung sind. (Tennakoon et al., 2006) So wurde zum Beispiel die bei MS verminderte Kontrolle von T-Zellen durch NK-Zellen aufgedeckt. (Gross et al., 2016) Die Rolle von defekten regulatorischen Zellen wurde darüber hinaus bereits für eine Reihe weiterer verschiedener Autoimmunerkrankungen beschrieben. (Brimnes et al., 2005; Jiang et al., 2010)

Für beide Szenarien gibt es einschlägige Studien. (Sinha et al., 2015) Wie unter 4.1.4 diskutiert scheint in den vorliegenden Proben die Rolle der regulatorischen T-Zellen möglich:

Durch das Heterodimer CD94-NKG2A wird die zytolytische Fähigkeit von T-Zellen inhibiert. Die T-Zellen können in der Folge nicht mehr supprimierend auf anderen Zellen wirken. (Sinha et al., 2015)

Ein Anstieg dieser CD94<sup>+</sup>-NKG2A<sup>+</sup>-CD8<sup>+</sup> Zellen findet sich dementsprechend im Vergleich zu Gesunden und zu Patienten in Remission v. a. bei Patienten mit akuter Exazerbation der Multiplen Sklerose. (Correale and Villa, 2008) Diese Verschlechterung ließe sich u. a. durch die verringerte HLA-E vermittelte zytolytische Aktivität der CD8<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen gegenüber von autoreaktiven CD4<sup>+</sup>-T-Zellen in Folge der NKG2A vermittelten Hemmung erklären. (Correale and Villa, 2008) Die zytolytische Aktivität könnte über Granzym B und Perforin vermittelt werden. (Correale and Villa, 2008)

Das bereits erwähnte HLA-E, ein nicht klassisches MHC-Ib-Molekül, das als Bindungspartner für NKG2-Genprodukte auf NK-Zellen und T-Zellen dient, scheint ein wichtiger Bestandteil dieses Regelkreises zu sein. Es ist nachgewiesenermaßen in MS-Läsionen der weißen Substanz gegenüber von Kontrollproben sowohl auf RNA Level als auch auf Proteinlevel erhöht. (Durrenberger et al., 2012) HLA-E wird in MS-Gehirnen vor allem auf CD8<sup>+</sup>-, CD4<sup>+</sup>- und B-Zellen und Mikroglia/Makrophagen exprimiert. (Pannemans et al., 2014) Auch in den in dieser Arbeit verwendeten Hirnproben wurde HLA-E nachgewiesen.



**Abbildung 29: CD8<sup>+</sup>-T-Zellen – pathogener Spieler oder Regulator der MS?** Dargestellt ist die angenommene duale Rolle von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen in der Multiplen Sklerose. Einerseits können sie Oligodendrozyten (ODC) schädigen, pro-inflammatorische Zytokine ausschütten, an der Akkumulation von Th17-Zellen beteiligt sein und zur Demyelinisierung führen (linke Bildhälfte). Andererseits greifen sie pathogene CD4<sup>+</sup> Zellen an, hemmen die Funktion von APZ sowie Makrophagen und Monozyten und können das Zytokinprofil in eine anti-inflammatorische Richtung lenken (rechte Bildhälfte). Sie können somit pathogen wirken, aber auch als Regulatoren der MS. (Sinha et al., 2015) Abkürzungen: CD4<sup>+</sup> T: CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, CD8<sup>+</sup> T: CD8<sup>+</sup>-T-Zellen. Modifiziert nach Sinha et al., 2015.

Ein Punkt, der allgemein für die große Bedeutung von regulatorischen Zellen im Verlauf der Erkrankung sprechen könnte, ist, dass zudem eine insgesamt verminderte Anzahl von potentiell regulatorischen T-Zellen während MS-Schüben festgestellt wurde. (Correale and Villa, 2008; Sinha et al., 2015) Ihre Anzahl kann durch die Behandlung mit Glukokortikoiden wieder gesteigert werden. (Sinha et al., 2015) Dazu passend wirkt das Medikament Copaxone (Wirkstoff Glatirameracetat) z. T. ebenfalls über HLA-E und die Induktion von regulatorischen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen. (Comi et al., 2001; Joosten et al., 2016; Sinha et al., 2015; Tyler et al., 2013) Neben diesen HLA-E abhängigen regulatorisch tätigen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen gibt es jedoch eine Reihe weiterer regulatorisch tätiger Zellsubtypen mit anderem Wirkmechanismus. (Sinha et al., 2014)

Weitere Studien sind nötig, um die aufgeführten Zusammenhänge besser zu beleuchten und zu bestätigen.

## 4.2 Suche nach dem Antigen von T-Zell Klon IP2-8S1

Der zweite große Bereich dieser Dissertation war die Suche nach dem Antigen des T-Zell-Klons IP2-8S1, der aus dem Gehirn eines Patienten mit GABA<sub>A</sub>-R-Enzephalitis isoliert worden war. Die dabei erreichten Ergebnisse und weitere wichtige Aspekte werden in den folgenden Abschnitten diskutiert.

#### **4.2.1 Nukleofektion als Transfektionsmethode**

Im Rahmen der Antigensuche für den Klon IP2-8S1 wurden zur Transfektion der als APZ fungierenden COS-7 Zellen zwei unterschiedliche Methoden verwendet. Zum einen Nukleofektion und zum anderen Transfektion mittels FuGENE®.

Wie in dieser Arbeit unter 3.2.2.1.1 festgestellt, ist die Transfektionseffizienz von COS-7 Zellen mit FuGENE® und Nucleofector getestet mittels sGFP-Expression vergleichbar. Der Grund dafür, dass die Versuche in dieser Dissertation dennoch mit dem Nucleofector durchgeführt wurden, liegt in Untersuchungen zur Anzahl von PECP-Kopien durch G. Rühl und M. Schönwetter begründet. Ihre Arbeiten in der Arbeitsgruppe zur Plasmidanzahl zu bestimmten Zeitpunkten nach Transfektion und Implikationen für die Antigensuche mit der PECP-Bibliothek ergaben, dass die Nukleofektion FuGENE® überlegen ist. (Rühl, 2016) Die Amplifikation, also die Vervielfältigung, der PECP-Kopien mittels des SV40 Replikationsursprungs in den COS-7 Zellen ist nach Transfektion mit FuGENE® nicht optimal, wohingegen sie mit Nukleofektion um ein Vielfaches besser ist (2,5fache Amplifikation vs. 30-100fache). (Rühl, 2016)

Es ist bekannt, dass für die Aktivierung von T-Zellen in vivo eine geringe Anzahl von Peptid-MHC-Komplexen auf der APZ ausreicht. (Sykulev et al., 1996; van der Merwe and Dushek, 2011) Bei T-Hybridomen kann jedoch nicht gesagt werden, ab welcher Oberflächendichte des stimulierenden Peptid-MHC-Komplexes die Zellen aktiviert werden. Somit besteht etwa bei der Präsentation von zu vielen unterschiedlichen Peptiden die Gefahr, dass jedes Peptid nur einmal auf der Oberfläche präsentiert wird, was für eine Aktivierung hier nicht ausreichend sein könnte. (Rühl, 2016)

G. Rühl kommt in ihrer Dissertation zu dem Schluss, dass deswegen die besten Chancen auf eine Aktivierung bestehen, wenn nicht zu viele verschiedene PECP-Kopien amplifiziert in einer COS-7 Zelle vorliegen, wobei die Anzahl unterschiedlicher PECP-Kopien pro Zelle dabei mit der Menge an transfizierter Probe steigt. Demnach wäre es besser, weniger Plasmide (z. B. 10 ng der PECPL) zu transfizieren. Gleichzeitig muss aber eine Vielzahl verschiedener PECP-Kopien überprüft werden, bis die Wahrscheinlichkeit groß ist, auf eine antigenkodierende Kopie zu stoßen. Dies ist leichter durchführbar, wenn in einem Versuch eine größere Anzahl von Kopien überprüft werden kann. (Rühl, 2016) In diesem Sinne wurden im Rahmen dieser Dissertation für die Antigensuche 1000 ng der PECP-Bibliothek transfiziert, um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, auf ein antigenkodierendes Plasmid zu stoßen. Eine derart transfizierte COS-7 Zelle enthält durchschnittlich 280 verschiedene PECP-Kopien. (Rühl, 2016)

#### **4.2.2 Untersuchung von Kandidatenantigenen von Klon IP2-8S1**

Im Rahmen dieser Dissertation wurden gezielt mehrere mögliche Antigene für IP2-8S1 getestet. Es wäre denkbar, dass der T-Zell-Klon IP2-8S1 ebenso wie u. U. ein entdeckter Antikörper von IP2 ursprünglich gegen ein im Rahmen von einer Tumor- oder anderen Autoimmunerkrankung relevantes Antigen gerichtet war. Durch das Erkennen eines ZNS-Antigens durch Kreuzreaktivität im Rahmen von molekularem Mimikry könnte die GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Enzephalitis ausgelöst worden sein. (Brändle, 2016)

Bei der GABA<sub>B</sub>-Rezeptor-Enzephalitis liegt bekanntermaßen oft ein kleinzelliger Lungenkrebs vor. (Lancaster and Dalmau, 2012) Bei der GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Enzephalitis besteht dagegen eine Assoziation zu Thymomen. (Petit-Pedrol et al., 2014; Spatola et al., 2017)

Somit wäre es denkbar, dass, auch wenn kein Tumor bei IP2 festgestellt wurde (Petit-Pedrol et al., 2014), der Erkrankung von IP2 ein paraneoplastischer Ursprung zu Grunde lag. Da ein untersuchter expandierter Antikörper von IP2 neben der  $\alpha_1$ -GABA<sub>A</sub>-Rezeptor Untereinheit auch CSRP2 erkannte (siehe 1.1.4.1.1.1), könnte es sein, dass zunächst die Antikörper gegen CSRP2 gebildet wurden. Diese reagierten in der Folge kreuzreaktiv mit dem GABA<sub>A</sub>-Rezeptor und führten somit zur Enzephalitis. (Brändle, 2016) Daher könnte es sein, dass auch der gefundene T-Zell-Klon IP2-8S1 Peptide generiert aus CSRP2 erkennt.

In Rahmen dieser Dissertation wurden daher die  $\alpha_1$ -GABA<sub>A</sub>-Rezeptor Untereinheit und CSRP2 mithilfe des ptt5 Vektors (und z. T. des RSV Vektors) in LCL-Zellen, die zusammengekommen das gesamte HLA-Spektrum von IP2 abdeckten, transfiziert.

Sowohl die transfizierten Zellen, als auch die entsprechenden untransfizierten Klone, konnten in einer Kokultur die T-Hybridome von IP2 jedoch nicht aktivieren. (siehe 3.2.2.2)

Die verschiedenen Gründe, die der Aktivierung entgegengestanden haben könnten, werden in den folgenden Abschnitten abgehandelt.

Ein allgemeiner, methodisch bedingter Punkt, der eine Aktivierung verhindert haben könnte, war möglicherweise ein nicht ausreichend guter Kontakt zwischen den LCL-Zellen als APZ und den T-Hybridomen. Dies könnte zum einen durch die Art der Kokultur an sich, aber auch durch eine Verdünnung tatsächlich transfizierter, vitaler antigenpräsentierender LCL-Zellen durch Debris und tote Zellen bedingt sein. Diese Debris, wenn auch durch besondere Maßnahmen so gut wie möglich aus der Kultur entfernt, könnte z. T. den Kontakt zwischen den beiden Zellsorten verringert oder sogar verhindert haben, und somit einer Antigenerkennung im Wege gestanden haben.

Eine endogene Aktivierung durch die untransfizierten EBV-transformierten B-Zellen (LCL-Zellen) wäre vor allem dann denkbar, wenn EBV eine Rolle in der Pathogenese dieser GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Enzephalitis spielen würde. Ein bekannter Zusammenhang besteht zwischen einer NMDA-Rezeptor-Enzephalitis als Folgekomplikation einer Herpes-Enzephalitis (Nosadini et al., 2017; Pruss et al., 2012; Schein et al., 2017), für GABA<sub>A</sub>-Autoimmunenkephalitiden ist ein ähnliches Phänomen bisher jedoch nicht beschrieben. Dass eine Triggerung von Autoimmunphänomenen wie Autoimmunenkephalitiden durch infektiöse Faktoren allgemein möglich und denkbar ist, ist jedoch allgemein bekannt. (Guan et al., 2016; Wucherpfennig, 2001) Insbesondere EBV-Infektionen werden zudem in der Genese einer Reihe von Autoimmunerkrankungen wie der MS diskutiert. (Ascherio and Munger, 2007a) Wie bereits erwähnt, zeigte sich jedoch keine Aktivierung des T-Zell-Klons durch untransfizierte EBV-B-Zellen.

Auch wenn die Rate der Zellen, die das transfizierte Protein exprimieren sollten, welche anhand von sGFP Kontrollen abgeschätzt werden konnte, bei bis zu 90 % lag, könnte dennoch die Prozessierung der Proteine durch die LCL-Zellen in vitro eine andere sein, als die in vivo Prozessierung durch autologe APZ. Auf diese Weise könnte das prozessierte und präsentierte Peptid schließlich zu keiner Aktivierung der T-Hybridome führen.

Zudem wurde nicht direkt per Western Blot überprüft, ob die Zellen auch wirklich die  $\alpha_1$ -GABA<sub>A</sub>-Rezeptor Untereinheit und CSRP2 exprimierten und wie hoch die Oberflächendichte von

entsprechenden MHC-Antigen-Komplexen tatsächlich war. Dies könnte in Folgeexperimenten berücksichtigt werden.

Hätte es sich statt um sGFP um ein zu präsentierendes Antigen gehandelt, wäre die Rate potentiell Antigen exprimierender Zellen mit dem RSV Vektor wohl zu gering gewesen, um eine sichtbare Aktivierung der T-Hybridome zu ermöglichen. Der ptt5 Vektor, mit dem das Experiment daher wiederholt wurde, erzielte zwar deutlich bessere Ergebnisse, doch auch hier gelten oben genannte Einschränkungen.

Im Rahmen dieser Arbeit gab es einen weiteren Test mit CSRP2-Kandidatenpeptiden transfiziert in COS-7 Zellen. (siehe 2.3.7.2.2.4) Dass es in dieser Art von Kokultur zu einer angemessenen Aktivierung von T-Hybridomen kommt, wurde schon in vielen Versuchen in unserer Arbeitsgruppe gezeigt, sodass die Bedingungen der Kokultur an sich nicht als Hindernis in Frage kommen. (Arakawa et al., 2015; Ruhl et al., 2016) Das Fehlen einer Aktivierung in den Kokulturen deutet also darauf hin, dass die getesteten Kandidaten nicht vom T-Zell-Klon erkannt werden.

Dies könnte damit in Übereinstimmung stehen, dass der isolierte T-Zell-Klon nicht die gleichen Antigene wie die entdeckten Antikörper erkennen muss, ebenso wie CD4<sup>+</sup> Zellen und CD8<sup>+</sup> Zellen eben nicht die gleiche Zielstruktur haben müssen. (Hohlfeld et al., 2016)

Darüber hinaus gilt es zu bedenken, dass es sich bei der GABA<sub>A</sub>-Rezeptor Enzephalitis um eine Erkrankung handelt, bei der die Zielstrukturen auf der Zelloberfläche zu finden sind. Im Rahmen der Erkrankung kann es zu einem, im Vergleich zu Autoimmunenzephalitiden mit onkoneuralen Antikörpern, geringen Absterben von Neuronen kommen. (Lancaster, 2016) Es kann dabei zur Freisetzung intrazellulärer Proteine kommen, gegen die dann eine zweite Immunantwort gerichtet sein könnte. Dies wäre auch denkbar für den entdeckten T-Zell-Klon, sodass er nicht der primäre Auslöser der Erkrankung, sondern nur eine zusätzliche Folge dieser wäre. Daher wäre er nicht gegen die Oberflächenantigene, sondern vielmehr gegen intrazelluläre unbeteiligte Proteine gerichtet.

Da durch die Analyse verschiedener potentieller Kandidaten das Antigen nicht ausfindig gemacht werden konnte, wurde weiter mit der unvoreingenommenen Methode mittels PECP-Bibliotheken gearbeitet.

### 4.2.3 Bedeutung der Spontanaktivierung

Die hier verwendete Technik der Antigensuche beruht auf der Identifizierung einzelner Cluster aktivierter T-Hybridomzellen in Millionen von Zellen. Diese hohe Sensitivität wurde durch das Auftreten spontanaktiver Zellen gestört. Auch wenn die Prozentzahlen spontanaktivierter T-Hybridome in den für Kokulturen verwendeten Klonen als sehr gering zu bezeichnen waren, stellten einzelne spontanaktivierte Zellen ein Problem dar.

In den Versuchen zur Spontanaktivierung in dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die zugrundeliegenden Vorgänge sehr dynamisch sein müssen, da Nachkommen einer aktivierten Zelle nicht automatisch weiter aktiviert waren und aktivierte Zellen wieder in den inaktivierten Zustand zurückkehren konnten. Trotz der gemeinsam mit E. Beltran durchgeführten Untersuchungen von GFP<sup>+</sup> spontanaktiven Zellen im Vergleich zu GFP<sup>-</sup> Zellen konnten auf Transkriptomebene keine ursächlichen unterschiedlich exprimierten Gene ausgemacht werden, die diesen Unterschied erklären könnten.



Somit bleibt die Frage, was zur Aktivierung der Zellen führte und wie damit in Zukunft umgegangen werden kann.

Gründe für die Aktivierung könnten Mediumbestandteile, in das Medium geratene Staubpartikel, Zell-Zell-Kontakte, ein verändertes Mikromilieu (v. a. im Rahmen der Kokultur) oder Ähnliches sein. Diese Trigger könnten dann in den Zellen eine Kette in Bewegung setzen, als deren wichtigster Spieler Calcium anzunehmen sein könnte.

Ein in letzter Zeit in den Fokus vieler Wissenschaftler gerücktes Thema umfasst die Schwankungen des intrazellulären Calcium-Spiegels als Folge von externen Einflüssen. In der Folge von Calcium-Veränderungen kommt es zu Änderungen der Genexpression. (Weaver, 2017) Länger andauernde Calcium-Plateaus führen zur Aktivierung und Translokation des Transkriptionsfaktors NFAT in den Nukleus der Zelle (Kyratsous et al., 2017), über den bei den in der Arbeitsgruppe Dornmair verwendeten Hybridomen u. a. die Expression von sGFP gesteuert wird. (Siewert et al., 2012) Durch diese spontanen (oder teils durch unbekannte Faktoren ausgelöste) Calcium-Erhöhungen lässt sich am ehesten die Spontanaktivierung und sGFP-Expression der T-Hybridome erklären.

Dass 58 $\alpha/\beta$ -T-Hybridome durch diese Spontanaktivierung eine Schwäche aufweisen, ist unbestreitbar, doch gilt es erst einen besseren Ersatz für sie zu finden. Bis dahin bedeuten die Ergebnisse, zu versuchen, durch Reklonierung und optimierte Kulturbedingungen den Grad der Spontanaktivierung auf ein möglichst geringes Maß zu reduzieren.

#### **4.2.4 Rolle der HLA-Restriktion**

Es wäre von höchster Relevanz die HLA-Restriktion von IP2-8S1 herauszufinden, da anstatt von 6 HLA-Molekülen dann nur noch die entsprechende HLA-Form überprüft werden müsste. Anhand der Daten dieser Arbeit, ist es jedoch nicht möglich, ein Überwiegen eines HLA-Moleküls mit Sicherheit festzustellen. Bei allen HLA-Molekülen wurde Aktivierung in ähnlicher Größenordnung wahrgenommen.

#### **4.2.5 Hinweise auf die entscheidende Rolle der Länge der PECP-Bibliothek**

Es konnte in unserer Arbeitsgruppe schon früher gezeigt werden, dass die Länge des präsentierten Peptides entscheidend ist für die Bindung an das jeweilige HLA-Molekül und die Aktivierung der T-Hybridome. (Ruhl et al., 2016) Somit ist also auch die Länge der verwendeten Peptid-Bibliothek von zentraler Bedeutung.

In dieser Arbeit wurde die N24 und N27 Bibliothek verwendet, wobei auf die gescreente Fläche bezogen eine erhöhte Frequenz von Clustern bei der N24 Bibliothek festgestellt wurde. (siehe 3.2.2.3.1.1)

Für die Zukunft bedeutet dies, dass zum einen noch weitere Versuche mit der N24 Bibliothek erfolgen sollten, da es sich mit höherer Wahrscheinlichkeit um ein 8er als ein 9er Peptid handelt. Diese Versuche werden derzeit in der Arbeitsgruppe fortgeführt.

Zum anderen könnten auch noch andere Längen untersucht werden, da TZR theoretisch Peptide mit einer Länge von bis zu 14 AS erkennen können. (Probst-Kepper et al., 2001)

#### **4.2.6 Limitationen bei Verwendung der unvoreingenommenen Methode mittels PECP-Bibliotheken**

Im Folgenden soll auf derzeit bestehende Limitationen und zukünftige Möglichkeiten der unvoreingenommenen Methode mittels PECP-Bibliotheken eingegangen werden.

Ein häufiges Problem bei aktivierten Clustern war, dass sie nicht fest auf den darunterliegenden COS-7 Zellen saßen. Somit waren sie nicht verwertbar, da nicht festgestellt werden konnte, von welcher APZ sie aktiviert worden waren. Durch Mediumbewegung oder bei Transport der Schale vom Inkubator auf den Mikroskopisch konnte der fragile Kontakt von T-Hybridomen und APZ gestört werden.

Ein weiterer Grund für den Verlust der Aktivierung kann zudem sein, dass sich die T-Hybridome teils auch von den APZ wegbewegen. In ihrer Arbeit war K. Siewert aufgefallen, dass sich 3 von 16 Zellen auch ohne Bewegung von außen im Laufe der Kokultur von ihrer APZ wegbewegen. (Siewert, 2011)

Dazu kommt, dass die COS-7 Zellen sowohl aneinander als auch an der Schale stark haften. Dadurch wurden bei der Isolierung der APZ mittels Glaskapillare oft mehrere aneinanderhängende COS-7 Zellen isoliert. Somit wurden nicht relevante Plasmide aus nicht aktivierenden APZ zusätzlich zu den nicht aktivierenden Plasmiden, die grundsätzlich neben dem aktivierenden Plasmid in der entsprechenden APZ und im mitisolierten Medium vorliegen, isoliert. Dadurch könnte das aktivierende Peptid in der Masse nicht aktivierender Peptide untergehen. Um dies zu vermeiden, könnte es helfen, weniger COS-7 Zellen pro Schale zu screenen, die somit leichter separat isoliert werden könnten. Andererseits würde dadurch die Screeningeffizienz vermindert und mehr Schalen müssten untersucht werden, um die gleiche Wahrscheinlichkeit der Entdeckung eines antigenkodierenden Plasmids zu gewährleisten.

Durch das starke Haften der COS-7 Zellen an der Schale konnten die Zellen bei Isolierung mittels Glaskapillare durch die entstehenden Scherkräfte zerreißen, wenn sie nicht vollständig vom Boden gelöst werden konnten. Im Rahmen dessen könnte das antigenkodierende Peptid ebenfalls verloren gehen.

Daneben gilt es mögliche Eigenschaften des antigenen Peptides zu beachten, die einer Identifizierung durch die angewandte unvoreingenommene Methode entgegenstehen. So könnte das Peptid selbst toxisch sein, hydrophob oder ein Polykation. In diesen Fällen könnte es nicht korrekt auf den APZ präsentiert werden und die T-Hybridome könnten dadurch nicht aktiviert werden, da das Peptid entweder die beteiligten Zellen schädigt oder mit der Membran oder der DNA interagiert.

Wenn das Peptid zudem eine Proteaseschnittstelle enthält, würde es degradiert und ebenfalls nicht richtig präsentiert.

Ein Großteil der genannten Unsicherheiten, der methodisch bedingt ist, könnte durch die Verwendung einer 384-Well-Platte für die Kokultur, wie von G. Rühl angedacht, vermieden werden.

384-Well-Platten könnten für die Kokultur einer kleinen Menge von transfizierten COS-7 Zellen mit T-Hybridomen benutzt werden. Wird in einem Well eine Aktivierung durch sGFP-Expression entdeckt, würden sämtliche COS-7 Zellen des Wells in PCRs weiter analysiert. Durch die Möglichkeit, das Well zu spülen und die COS-7 Zellen schonender mit Pipetten zu lösen, entfielen die Gefahr, durch Zerreißen der COS-7 Zellen bei Isolierung mittels Glaskapillare wie bisher das Antigen kodierende Plasmid zu verlieren. (Rühl, 2016)

Statt wie zuvor nach Entdeckung von Aktivierung mittels Subpools schließlich die aktivierende PECP-Kopie auszumachen, wurde im Rahmen dieser Dissertation die Retransfektion isolierter und vervielfältigter PECP-Kopien und das erneute Isolieren von aktivierenden Kopien aus diesen Retransfektionen getestet.

Da in einer COS-7 Zelle durchschnittlich nach Transfektion mit 1000 ng Probe nur noch 280 verschiedene PECP-Kopien enthalten sind, verspricht dieser Ansatz schnell das aktivierende Peptid innerhalb weniger Runden Retransfektion ausfindig machen zu können.

In Zukunft könnten, statt wie gehabt 1000 ng der isolierten Probe zur Retransfektion zu nutzen, durch die Verwendung niedrigerer Mengen weniger verschiedene Plasmide pro Zelle analysiert werden. Somit könnte bei ausreichend großen gescreenten Flächen das antigene Peptid noch leichter aufgedeckt werden.

Eine Verbindung beider Techniken, der 384-Well-Platte und der Retransfektion isolierter PECP-Kopien, wäre wohl aussichtsreich.

### 4.3 Ausblick

Auch wenn wir davon ausgehen können, dass der Klon IP2-8S1 eine wichtige Rolle in der Erkrankung von IP2 gespielt hat, kann derzeit nicht gesagt werden, welche Rolle er dabei genau einnimmt, da das erkannte Antigen bisher nicht identifiziert werden konnte. Jedoch konnten im Rahmen dieser Dissertation wertvolle Hinweise u. a. in Hinblick auf die Länge des erkannten Peptides gesammelt werden. Darauf aufbauend werden derzeit weitere Experimente in der Arbeitsgruppe durchgeführt. Hierbei ist es wichtig, größere Flächen vor allem mit der N24-Bibliothek zu screenen, da sich in dieser Arbeit Hinweise auf eine Bevorzugung von 8er-Peptiden ergaben.

Eine Reihe von Kandidatenantigenen wurde im Laufe der Arbeiten für diese Dissertation getestet. Für die Überprüfung von möglichen weiteren Kandidaten könnten in Zukunft neben COS-7 Zellen auch LCL-Zellen mit den in dieser Arbeit verbesserten Transfektionsbedingungen als erfolgsversprechende APZ angewandt werden.

Der Versuchsaufbau unter Verwendung der 384-Well Platte sollte geplant werden.

Das im Rahmen dieser Dissertation untersuchte Problem der Spontanaktivierung wird weiterhin eine Herausforderung sein, der es mittels Reklonierung und optimalen Kulturbedingungen entgegenzuwirken gilt.

Da die Gruppe der Erkrankung der Autoimmunenzephalitiden noch nicht allzu lange bekannt ist und beständig neue Unterformen aufgetan werden (Guan et al., 2016; Panzer and Lyons, 2016), ist es darüber hinaus wichtig, ein gesteigertes Bewusstsein für die Existenz dieser Erkrankungen zu schaffen. Teilweise wurden bei 11,6 % der Patienten aus dem psychiatrischen Akutbehandlungsbereich anti-neuronale Antikörper im Serum nachgewiesen. (Schou et al., 2016) Auch wenn die klinische Signifikanz der Antikörper in diesem Bereich weiterer Studien bedarf (Schou et al., 2016; Schou et al., 2019; Schou et al., 2018), ist es wichtig, durch Antikörper-Screenings bei Warnzeichen v. a. bei Erstdiagnosen von psychiatrischen Erkrankungen die autoimmune Genese der jeweiligen Störungen so gut wie möglich auszuschließen.

Bei Auftreten von sogenannten *Yellow* oder *Red Flags* (epileptische Anfälle und Auffälligkeiten im MRT und/oder EEG) bei psychiatrischen Erkrankungen sollte in jedem Fall eine Abklärung einer autoimmunen Genese durchgeführt werden. (Herken and Pruss, 2017)

Die Erkrankung Multiple Sklerose bleibt eine Entität, die Forschern und Klinikern weiterhin viele Rätsel aufgibt. Die im Rahmen dieser Dissertation gesammelten Ergebnisse zur Expression von NKG2-Molekülen sind in Übereinstimmung mit einem komplexen Zusammenspiel von verschiedenen Zellpopulationen, das die Krankheit in ihren unterschiedlichen Verlaufsformen prägen könnte.

Um weitere Hinweise zur Aufdeckung der Rolle der untersuchten Zellpopulation zu sammeln, wäre es von großer Relevanz in zukünftigen Experimenten die Nachbarschaftsbeziehungen der untersuchten CD94<sup>+</sup>-CD8α<sup>+</sup>-T-Zellen zu entweder HLA-E exprimierenden CD4<sup>+</sup>-T-Zellen oder anderen Zellen wie Makrophagen zu untersuchen. Zuvor sollte eine eindeutige Klärung erfolgen, dass es sich um T-Zellen und nicht NK-T-Zellen handelt. (siehe 4.1.3) Die Analyse der Nachbarschaftsbeziehungen sollte unter Berücksichtigung des jeweils exprimierten NKG2-Subtypes erfolgen.

Z. B. mittels einer in unserer Arbeitsgruppe entwickelten Technik zur Analyse von Kommunikationspartnern über die vektorielle Expression von Perforin wäre es möglich, mehr über die Zielzellen und somit die Funktion der interessierenden Zellen zu erfahren. Bei einer ähnlichen Untersuchung anhand von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen in z. T. den gleichen Gebieten des Patienten A hatten sich CD11b<sup>+</sup> und CD163<sup>+</sup> mononukleäre Phagozyten als anzunehmende Interaktionspartner herausgestellt. (Konjevic Sabolek et al., 2019) Es wäre in der Folge interessant zu sehen, ob diese CD8<sup>+</sup>-T-Zellen ebenfalls CD94 und NKG2-Moleküle exprimieren, bzw. welche Interaktionspartner für CD94<sup>+</sup>-CD8<sup>+</sup>-NKG2<sup>+</sup>-T-Zellen ausgemacht werden können.

Es kann derzeit nur spekuliert werden, dass Schübe bei MS durch eine Minderfunktion von regulatorischen T-Zellen (mit)erklärt werden könnten, die in ihrer Rolle der Kontrolle von Autoimmunität versagen. Viel deutet darauf hin, dass verschiedene CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Subtypen unterschiedliche Rollen in der Erkrankung einnehmen könnten. (Sinha et al., 2015) NKG2/CD94 Heterodimere könnten die Modulation der Antigenantwort auf CD8<sup>+</sup>-T-Zellen beeinflussen. Zu diesem Thema werden jedoch weitere Studien nötig sein, bevor ein umfassendes Verständnis aller Zusammenhänge erreicht werden kann.

In den letzten 20 Jahren sind einige *disease modifying drugs* für die Erkrankung MS zugelassen worden, wie Interferon β und Glatirameracetat. (Selter and Hemmer, 2013) Die Medikamente wirken vor allem immunmodulatorisch, immunsuppressiv oder gezielt auf die Migration von Immunzellen ins ZNS. Eine Reihe von Antikörpern gegen spezifische Oberflächenmarker führen zu einer Depletion der jeweiligen Ak-tragenden Zellen und führen so zu einem positiven Effekt. Derart wirkt auch der CD20-Ak Rituximab gegen B-Zellen. (Selter and Hemmer, 2013) Entdeckungen in der Grundlagenforschung unterstützen die Entwicklung von neuen Medikamenten. Beispielsweise Daclizumab, das die eingeschränkte Kontrolle von NK-Zellen über T-Zellen wieder herstellt. Teilweise zeigen sich jedoch im Verlauf der klinischen Anwendungen ernste Nebenwirkungen, sodass Medikamente wieder aus dem Verkehr gezogen werden müssen, wie bei Daclizumab 2018 geschehen. (siehe 1.1.4.1.2.1) Dies führt uns einmal mehr vor Augen, dass, trotz des fortgeschrittenen Verständnis für die

Zusammenspiele bei der Entstehung und Aufrechterhaltung der MS, die Feinregulationen, sowie sämtliche Kreuzreaktionen und Interaktionen, noch nicht verstanden sind.

Viele Medikamente hatten bisher primär CD4<sup>+</sup> Zellen als Ziel und wirken sekundär auf andere Zellen. Da CD8<sup>+</sup> Zellen aber wie gezeigt immer mehr als zentrale Spieler der Erkrankung anerkannt werden, sollten in Zukunft gezielt mehr Medikamente, mit dem Ziel CD8<sup>+</sup> Zellen zu beeinflussen, entwickelt werden. (Saxena et al., 2011)

Auch allgemein gilt, dass durch die weitere Erforschung der genauen Rolle von T-Zellen bei Autoimmunerkrankungen neben einem besseren Verständnis der Pathogenese dieser Erkrankungen auch die Möglichkeit der Schaffung von neuen Behandlungsansätzen entsteht.

## Literaturverzeichnis

- Adey, A., Morrison, H.G., Asan, Xun, X., Kitzman, J.O., Turner, E.H., Stackhouse, B., MacKenzie, A.P., Caruccio, N.C., Zhang, X., *et al.* (2010). Rapid, low-input, low-bias construction of shotgun fragment libraries by high-density in vitro transposition. *Genome biology* 11, R119.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215, 403-410.
- Arakawa, A., Siewert, K., Stohr, J., Besgen, P., Kim, S.M., Ruhl, G., Nickel, J., Vollmer, S., Thomas, P., Krebs, S., *et al.* (2015). Melanocyte antigen triggers autoimmunity in human psoriasis. *J Exp Med* 212, 2203-2212.
- Arlettaz, L., Villard, J., de Rham, C., Degermann, S., Chapuis, B., Huard, B., and Roosnek, E. (2004). Activating CD94:NKG2C and inhibitory CD94:NKG2A receptors are expressed by distinct subsets of committed CD8<sup>+</sup> TCR alpha beta lymphocytes. *European journal of immunology* 34, 3456-3464.
- Arstila, T.P., Casrouge, A., Baron, V., Even, J., Kanellopoulos, J., and Kourilsky, P. (1999). A direct estimate of the human alpha beta T cell receptor diversity. *Science (New York, NY)* 286, 958-961.
- Ascherio, A., and Munger, K.L. (2007a). Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role of infection. *Annals of neurology* 61, 288-299.
- Ascherio, A., and Munger, K.L. (2007b). Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part II: Noninfectious factors. *Annals of neurology* 61, 504-513.
- Babbe, H., Roers, A., Waisman, A., Lassmann, H., Goebels, N., Hohlfeld, R., Friese, M., Schroder, R., Deckert, M., Schmidt, S., *et al.* (2000). Clonal expansions of CD8<sup>+</sup> T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction. *J Exp Med* 192, 393-404.
- Backes, A. (2010). Untersuchungen zur Identifizierung und Charakterisierung autoaggressiver CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Multipler Sklerose. In Fakultät für Biologie (Ludwig-Maximilians-Universität München).
- Bauer, S., Groh, V., Wu, J., Steinle, A., Phillips, J.H., Lanier, L.L., and Spies, T. (1999). Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science (New York, NY)* 285, 727-729.
- Baughman, E.J., Mendoza, J.P., Ortega, S.B., Ayers, C.L., Greenberg, B.M., Frohman, E.M., and Karandikar, N.J. (2011). Neuroantigen-Specific CD8<sup>+</sup> Regulatory T-Cell Function is Deficient During Acute Exacerbation of Multiple Sclerosis. *Journal of autoimmunity* 36, 115-124.
- Beecham, A.H., Patsopoulos, N.A., Xifara, D.K., Davis, M.F., Kempainen, A., Cotsapas, C., Shah, T.S., Spencer, C., Booth, D., Goris, A., *et al.* (2013). Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis. *Nature genetics* 45, 1353-1360.
- Bellón, T., Heredia, A.B.d., Llano, M., Minguela, A., Rodriguez, A., López-Botet, M., and Aparicio, P. (1999). Triggering of Effector Functions on a CD8<sup>+</sup> T Cell Clone Upon the Aggregation of an Activatory CD94/kp39 Heterodimer. *The Journal of Immunology* 162, 3996-4002.
- Beziat, V., Hervier, B., Achour, A., Boutolleau, D., Marfain-Koka, A., and Vieillard, V. (2011). Human NKG2A overrides NKG2C effector functions to prevent autoreactivity of NK cells. *Blood* 117, 4394-4396.
- Biassoni, R., Cantoni, C., Falco, M., Pende, D., Millo, R., Moretta, L., Bottino, C., and Moretta, A. (2000). Human natural killer cell activating receptors. *Mol Immunol* 37, 1015-1024.
- Blum, J.S., Wearsch, P.A., and Cresswell, P. (2013). Pathways of antigen processing. *Annual review of immunology* 31, 443-473.
- Borrego, F., Kabat, J., Kim, D.K., Lieto, L., Maasho, K., Pena, J., Solana, R., and Coligan, J.E. (2002). Structure and function of major histocompatibility complex (MHC) class I specific receptors expressed on human natural killer (NK) cells. *Mol Immunol* 38, 637-660.
- Borrego, F., Masilamani, M., Marusina, A.I., Tang, X., and Coligan, J.E. (2006). The CD94/NKG2 family of receptors: from molecules and cells to clinical relevance. *Immunologic research* 35, 263-278.
- Borrego, F., Ulbrecht, M., Weiss, E.H., Coligan, J.E., and Brooks, A.G. (1998). Recognition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-E complexed with HLA class I signal sequence-derived

- peptides by CD94/NKG2 confers protection from natural killer cell-mediated lysis. *J Exp Med* 187, 813-818.
- Brändle, S.M. (2016). Analysis of oligoclonal band antibodies from patients with neurological diseases. In Institut für klinische Neuroimmunologie (Ludwig-Maximilians-Universität).
- Brandle, S.M., Obermeier, B., Senel, M., Bruder, J., Mentele, R., Khademi, M., Olsson, T., Tumani, H., Kristoferitsch, W., Lottspeich, F., *et al.* (2016). Distinct oligoclonal band antibodies in multiple sclerosis recognize ubiquitous self-proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, 7864-7869.
- Braud, V.M., Aldemir, H., Breart, B., and Ferlin, W.G. (2003). Expression of CD94-NKG2A inhibitory receptor is restricted to a subset of CD8+ T cells. *Trends in immunology* 24, 162-164.
- Braud, V.M., Allan, D.S., O'Callaghan, C.A., Soderstrom, K., D'Andrea, A., Ogg, G.S., Lazetic, S., Young, N.T., Bell, J.I., Phillips, J.H., *et al.* (1998). HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* 391, 795-799.
- Brimnes, J., Allez, M., Dotan, I., Shao, L., Nakazawa, A., and Mayer, L. (2005). Defects in CD8+ regulatory T cells in the lamina propria of patients with inflammatory bowel disease. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 174, 5814-5822.
- Bronstein-Sitton, N., Wang, L., Cohen, L., and Baniyash, M. (1999). Expression of the T cell antigen receptor zeta chain following activation is controlled at distinct checkpoints. Implications for cell surface receptor down-modulation and re-expression. *J Biol Chem* 274, 23659-23665.
- Brostjan, C., Bellón, T., Sobanov, Y., López-Botet, M., and Hofer, E. (2002). Differential expression of inhibitory and activating CD94/NKG2 receptors on NK cell clones. *Journal of Immunological Methods* 264, 109-119.
- Bulitta, B., Zuschratter, W., Bernal, I., Bruder, D., Klawonn, F., von Bergen, M., Garritsen, H.S.P., and Jansch, L. (2018). Proteomic definition of human mucosal-associated invariant T cells determines their unique molecular effector phenotype. *European journal of immunology*.
- Burrows, S.R., Rossjohn, J., and McCluskey, J. (2006). Have we cut ourselves too short in mapping CTL epitopes? *Trends in immunology* 27, 11-16.
- Carena, I., Shamshiev, A., Donda, A., Colonna, M., and Libero, G.D. (1997). Major histocompatibility complex class I molecules modulate activation threshold and early signaling of T cell antigen receptor-gamma/delta stimulated by nonpeptidic ligands. *J Exp Med* 186, 1769-1774.
- Clambey, E.T., Davenport, B., Kappler, J.W., Marrack, P., and Homann, D. (2014). Molecules in medicine mini review: the alphabeta T cell receptor. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 92, 735-741.
- Clevers, H., Alarcon, B., Wileman, T., and Terhorst, C. (1988). The T cell receptor/CD3 complex: a dynamic protein ensemble. *Annual review of immunology* 6, 629-662.
- Cole, D.K., Laugel, B., Clement, M., Price, D.A., Wooldridge, L., and Sewell, A.K. (2012). The molecular determinants of CD8 co-receptor function. *Immunology* 137, 139-148.
- Collins, E.J., Garboczi, D.N., and Wiley, D.C. (1994). Three-dimensional structure of a peptide extending from one end of a class I MHC binding site. *Nature* 371, 626-629.
- Comi, G., Filippi, M., and Wolinsky, J.S. (2001). European/Canadian multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled study of the effects of glatiramer acetate on magnetic resonance imaging--measured disease activity and burden in patients with relapsing multiple sclerosis. European/Canadian Glatiramer Acetate Study Group. *Annals of neurology* 49, 290-297.
- Compston, A., and Coles, A. (2008). Multiple sclerosis. *The Lancet* 372, 1502-1517.
- Correale, J., and Villa, A. (2008). Isolation and characterization of CD8+ regulatory T cells in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 195, 121-134.
- Cossette, P., Liu, L., Brisebois, K., Dong, H., Lortie, A., Vanasse, M., Saint-Hilaire, J.M., Carmant, L., Verner, A., Lu, W.Y., *et al.* (2002). Mutation of GABRA1 in an autosomal dominant form of juvenile myoclonic epilepsy. *Nature genetics* 31, 184-189.
- Czerkinsky, C.C., Nilsson, L.A., Nygren, H., Ouchterlony, O., and Tarkowski, A. (1983). A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells. *J Immunol Methods* 65, 109-121.

- Dalmau, J., and Rosenfeld, M.R. (2008). Paraneoplastic syndromes of the CNS. *Lancet neurology* 7, 327-340.
- Darnell, R.B. (1996). Onconeural antigens and the paraneoplastic neurologic disorders: at the intersection of cancer, immunity, and the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 4529-4536.
- Davis, M.M., and Bjorkman, P.J. (1988). T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* 334, 395-402.
- Dendrou, C.A., Fugger, L., and Friese, M.A. (2015). Immunopathology of multiple sclerosis. *Nature reviews Immunology* 15, 545-558.
- Di Tommaso, P., Moretti, S., Xenarios, I., Orobittg, M., Montanyola, A., Chang, J.M., Taly, J.F., and Notredame, C. (2011). T-Coffee: a web server for the multiple sequence alignment of protein and RNA sequences using structural information and homology extension. *Nucleic acids research* 39, W13-17.
- Dornmair, K., Goebels, N., Weltzien, H.U., Wekerle, H., and Hohlfeld, R. (2003). T-cell-mediated autoimmunity: novel techniques to characterize autoreactive T-cell receptors. *The American journal of pathology* 163, 1215-1226.
- Dornmair, K., Meinl, E., and Hohlfeld, R. (2009). Novel approaches for identifying target antigens of autoreactive human B and T cells. *Seminars in immunopathology* 31, 467-477.
- Durrenberger, P.F., Webb, L.V., Sim, M.J., Nicholas, R.S., Altmann, D.M., and Boyton, R.J. (2012). Increased HLA-E expression in white matter lesions in multiple sclerosis. *Immunology* 137, 317-325.
- Ekeruche-Makinde, J., Miles, J.J., van den Berg, H.A., Skowera, A., Cole, D.K., Dolton, G., Schauenburg, A.J., Tan, M.P., Pentier, J.M., Llewellyn-Lacey, S., *et al.* (2013). Peptide length determines the outcome of TCR/peptide-MHCI engagement. *Blood* 121, 1112-1123.
- Freedman, M.S., Ruijs, T.C., Selin, L.K., and Antel, J.P. (1991). Peripheral blood gamma-delta T cells lyse fresh human brain-derived oligodendrocytes. *Annals of neurology* 30, 794-800.
- Gibbings, D.J., Marcet-Palacios, M., Sekar, Y., Ng, M.C., and Befus, A.D. (2007). CD8 alpha is expressed by human monocytes and enhances Fc gamma R-dependent responses. *BMC immunology* 8, 12.
- Godfrey, D.I., Pellicci, D.G., Patel, O., Kjer-Nielsen, L., McCluskey, J., and Rossjohn, J. (2010). Antigen recognition by CD1d-restricted NKT T cell receptors. *Seminars in immunology* 22, 61-67.
- Gonzalez-Burgos, G., Fish, K.N., and Lewis, D.A. (2011). GABA neuron alterations, cortical circuit dysfunction and cognitive deficits in schizophrenia. *Neural plasticity* 2011, 723184.
- Graus, F., and Dalmau, J. (2012). Paraneoplastic neurological syndromes. *Curr Opin Neurol* 25, 795-801.
- Gross, C.C., Schulte-Mecklenbeck, A., Runzi, A., Kuhlmann, T., Posevitz-Fejfar, A., Schwab, N., Schneider-Hohendorf, T., Herich, S., Held, K., Konjevic, M., *et al.* (2016). Impaired NK-mediated regulation of T-cell activity in multiple sclerosis is reconstituted by IL-2 receptor modulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, E2973-2982.
- Guan, H.Z., Ren, H.T., and Cui, L.Y. (2016). Autoimmune Encephalitis: An Expanding Frontier of Neuroimmunology. *Chinese medical journal* 129, 1122-1127.
- Guery, L., and Hugues, S. (2015). Th17 Cell Plasticity and Functions in Cancer Immunity. *BioMed research international* 2015, 314620.
- Gundlach, B.R., Wiesmuller, K.H., Junt, T., Kienle, S., Jung, G., and Walden, P. (1996). Determination of T cell epitopes with random peptide libraries. *J Immunol Methods* 192, 149-155.
- Gunturi, A., Berg, R.E., and Forman, J. (2003). Preferential survival of CD8 T and NK cells expressing high levels of CD94. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 170, 1737-1745.
- Gunturi, A., Berg, R.E., and Forman, J. (2004). The role of CD94/NKG2 in innate and adaptive immunity. *Immunologic research* 30, 29-34.
- Guo, H.C., Jardetzky, T.S., Garrett, T.P., Lane, W.S., Strominger, J.L., and Wiley, D.C. (1992). Different length peptides bind to HLA-Aw68 similarly at their ends but bulge out in the middle. *Nature* 360, 364-366.
- Held, K., Bhonsle-Deeng, L., Siewert, K., Sato, W., Beltran, E., Schmidt, S., Ruhl, G., Ng, J.K., Engerer, P., Moser, M., *et al.* (2015). alphabeta T-cell receptors from multiple sclerosis brain lesions show MAIT cell-related features. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 2, e107.



- Herken, J., and Pruss, H. (2017). Red Flags: Clinical Signs for Identifying Autoimmune Encephalitis in Psychiatric Patients. *Frontiers in psychiatry* 8, 25.
- Herzog, J., Maekawa, Y., Cirrito, T.P., Illian, B.S., and Unanue, E.R. (2005). Activated antigen-presenting cells select and present chemically modified peptides recognized by unique CD4 T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 7928-7933.
- Hestvik, A.L. (2010). The double-edged sword of autoimmunity: lessons from multiple sclerosis. *Toxins* 2, 856-877.
- Hoffmann, C., Mao, X., Dieterle, M., Moreau, F., Al Absi, A., Steinmetz, A., Oudin, A., Berchem, G., Janji, B., and Thomas, C. (2016). CRP2, a new invadopodia actin bundling factor critically promotes breast cancer cell invasion and metastasis. *Oncotarget* 7, 13688-13705.
- Hohlfeld, R., Dornmair, K., Meinl, E., and Wekerle, H. (2015). The search for the target antigens of multiple sclerosis, part 1: autoreactive CD4+ T lymphocytes as pathogenic effectors and therapeutic targets. *The Lancet Neurology*.
- Hohlfeld, R., Dornmair, K., Meinl, E., and Wekerle, H. (2016). The search for the target antigens of multiple sclerosis, part 2: CD8+ T cells, B cells, and antibodies in the focus of reverse-translational research. *The Lancet Neurology* 15, 317-331.
- Hosie, A.M., Dunne, E.L., Harvey, R.J., and Smart, T.G. (2003). Zinc-mediated inhibition of GABA(A) receptors: discrete binding sites underlie subtype specificity. *Nature neuroscience* 6, 362-369.
- Houchins, J.P., Lanier, L.L., Niemi, E.C., Phillips, J.H., and Ryan, J.C. (1997). Natural killer cell cytolytic activity is inhibited by NKG2-A and activated by NKG2-C. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 158, 3603-3609.
- Houchins, J.P., Yabe, T., McSherry, C., and Bach, F.H. (1991). DNA sequence analysis of NKG2, a family of related cDNA clones encoding type II integral membrane proteins on human natural killer cells. *J Exp Med* 173, 1017-1020.
- Huang, H., Wang, X., Zhang, Y., Zheng, X., Wei, H., and Sun, R. (2010). Up-regulation of NKG2F receptor, a functionally unknown killer receptor, of human natural killer cells by interleukin-2 and interleukin-15. *Oncol Rep* 24, 1043-1048.
- Jain, M.K., Kashiki, S., Hsieh, C.M., Layne, M.D., Yet, S.F., Sibinga, N.E., Chin, M.T., Feinberg, M.W., Woo, I., Maas, R.L., *et al.* (1998). Embryonic expression suggests an important role for CRP2/SmLIM in the developing cardiovascular system. *Circulation research* 83, 980-985.
- Jaroszeski, M.J., and Radcliff, G. (1999). Fundamentals of flow cytometry. *Molecular biotechnology* 11, 37-53.
- Jiang, H., Canfield, S.M., Gallagher, M.P., Jiang, H.H., Jiang, Y., Zheng, Z., and Chess, L. (2010). HLA-E-restricted regulatory CD8(+) T cells are involved in development and control of human autoimmune type 1 diabetes. *The Journal of clinical investigation* 120, 3641-3650.
- Joosten, S.A., Sullivan, L.C., and Ottenhoff, T.H. (2016). Characteristics of HLA-E Restricted T-Cell Responses and Their Role in Infectious Diseases. *Journal of immunology research* 2016, 2695396.
- Jurewicz, A., Biddison, W.E., and Antel, J.P. (1998). MHC Class I-Restricted Lysis of Human Oligodendrocytes by Myelin Basic Protein Peptide-Specific CD8 T Lymphocytes. *The Journal of Immunology* 160, 3056-3059.
- Kaiser, B.K., Barahmand-pour, F., Paulsene, W., Medley, S., Geraghty, D.E., and Strong, R.K. (2005). Interactions between NKG2x Immunoreceptors and HLA-E Ligands Display Overlapping Affinities and Thermodynamics. *The Journal of Immunology* 174, 2878-2884.
- Kanaji, N., Watanabe, N., Kita, N., Bandoh, S., Tadokoro, A., Ishii, T., Dobashi, H., and Matsunaga, T. (2014). Paraneoplastic syndromes associated with lung cancer. *World Journal of Clinical Oncology* 5, 197-223.
- Kim, D.K., Kabat, J., Borrego, F., Sanni, T.B., You, C.H., and Coligan, J.E. (2004). Human NKG2F is expressed and can associate with DAP12. *Mol Immunol* 41, 53-62.
- Kjer-Nielsen, L., Patel, O., Corbett, A.J., Le Nours, J., Meehan, B., Liu, L., Bhati, M., Chen, Z., Kostenko, L., Reantragoon, R., *et al.* (2012). MR1 presents microbial vitamin B metabolites to MAIT cells. *Nature* 491, 717-723.

- Kniepert, A., and Groettrup, M. (2014). The unique functions of tissue-specific proteasomes. *Trends in biochemical sciences* 39, 17-24.
- Konjevic Sabolek, M., Held, K., Beltrán, E., Niedl, A.G., Meinl, E., Hohlfeld, R., Lassmann, H., and Dornmair, K. (2019). Communication of CD8+ T cells with mononuclear phagocytes in multiple sclerosis. *Annals of Clinical and Translational Neurology* 0.
- Kosa, J.L., Michelsen, J.W., Louis, H.A., Olsen, J.I., Davis, D.R., Beckerle, M.C., and Winge, D.R. (1994). Common metal ion coordination in LIM domain proteins. *Biochemistry* 33, 468-477.
- Kyratsous, N.I., Bauer, I.J., Zhang, G., Pesic, M., Bartholomaeus, I., Mues, M., Fang, P., Worner, M., Everts, S., Ellwart, J.W., *et al.* (2017). Visualizing context-dependent calcium signaling in encephalitogenic T cells in vivo by two-photon microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114, E6381-e6389.
- Lancaster, E. (2016). The Diagnosis and Treatment of Autoimmune Encephalitis. *J Clin Neurol* 12, 1-13.
- Lancaster, E., and Dalmau, J. (2012). Neuronal autoantigens--pathogenesis, associated disorders and antibody testing. *Nat Rev Neurol* 8, 380-390.
- Langrish, C.L., Chen, Y., Blumenschein, W.M., Mattson, J., Basham, B., Sedgwick, J.D., McClanahan, T., Kastelein, R.A., and Cua, D.J. (2005). IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* 201, 233-240.
- Lanier, L.L. (2008). Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nature immunology* 9, 495-502.
- Lanier, L.L., Corliss, B., Wu, J., and Phillips, J.H. (1998). Association of DAP12 with Activating CD94/NKG2C NK Cell Receptors. *Immunity* 8, 693-701.
- Lawand, M., Dechanet-Merville, J., and Dieu-Nosjean, M.C. (2017). Key Features of Gamma-Delta T-Cell Subsets in Human Diseases and Their Immunotherapeutic Implications. *Frontiers in immunology* 8, 761.
- Lazetic, S., Chang, C., Houchins, J.P., Lanier, L.L., and Phillips, J.H. (1996). Human natural killer cell receptors involved in MHC class I recognition are disulfide-linked heterodimers of CD94 and NKG2 subunits. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 157, 4741-4745.
- Lee, W.J., Lee, S.T., Moon, J., Sunwoo, J.S., Byun, J.I., Lim, J.A., Kim, T.J., Shin, Y.W., Lee, K.J., Jun, J.S., *et al.* (2016). Tocilizumab in Autoimmune Encephalitis Refractory to Rituximab: An Institutional Cohort Study. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 13, 824-832.
- Letourneur, F., and Malissen, B. (1989). Derivation of a T cell hybridoma variant deprived of functional T cell receptor alpha and beta chain transcripts reveals a nonfunctional alpha-mRNA of BW5147 origin. *European journal of immunology* 19, 2269-2274.
- Leypoldt, F., and Wandinger, K.P. (2014). Paraneoplastic neurological syndromes. *Clinical and Experimental Immunology* 175, 336-348.
- Li, J., Goldstein, I., Glickman-Nir, E., Jiang, H., and Chess, L. (2001). Induction of TCR Vbeta-specific CD8+ CTLs by TCR Vbeta-derived peptides bound to HLA-E. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 167, 3800-3808.
- Lorenz-Guertin, J.M., and Jacob, T.C. (2017). GABA type a receptor trafficking and the architecture of synaptic inhibition. *Developmental neurobiology*.
- Louis, H.A., Pino, J.D., Schmeichel, K.L., Pomies, P., and Beckerle, M.C. (1997). Comparison of three members of the cysteine-rich protein family reveals functional conservation and divergent patterns of gene expression. *J Biol Chem* 272, 27484-27491.
- Lucchinetti, C., Brück, W., Parisi, J., Scheithauer, B., Rodriguez, M., and Lassmann, H. (2000). Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: Implications for the pathogenesis of demyelination. *Annals of neurology* 47, 707-717.
- Mallewaey, T., Clarke, A.J., Scott-Browne, J.P., Young, M.H., Roisman, L.C., Pellicci, D.G., Patel, O., Vivian, J.P., Matsuda, J.L., McCluskey, J., *et al.* (2011). A molecular basis for NKT cell recognition of CD1d-self-antigen. *Immunity* 34, 315-326.

- Martin, E., Treiner, E., Duban, L., Guerri, L., Laude, H., Toly, C., Premel, V., Devys, A., Moura, I.C., Tilloy, F., *et al.* (2009). Stepwise development of MAIT cells in mouse and human. *PLoS biology* 7, e54.
- Mason, D. (1998). A very high level of crossreactivity is an essential feature of the T-cell receptor. *Immunology today* 19, 395-404.
- Matsui, K., Boniface, J.J., Reay, P.A., Schild, H., Fazekas de St Groth, B., and Davis, M.M. (1991). Low affinity interaction of peptide-MHC complexes with T cell receptors. *Science (New York, NY)* 254, 1788-1791.
- Matthews, J.M., Lester, K., Joseph, S., and Curtis, D.J. (2013). LIM-domain-only proteins in cancer. *Nat Rev Cancer* 13, 111-122.
- McMahon, C.W., and Raulet, D.H. (2001). Expression and function of NK cell receptors in CD8+ T cells. *Current opinion in immunology* 13, 465-470.
- McMahon, C.W., Zajac, A.J., Jamieson, A.M., Corral, L., Hammer, G.E., Ahmed, R., and Raulet, D.H. (2002). Viral and bacterial infections induce expression of multiple NK cell receptors in responding CD8(+) T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 169, 1444-1452.
- Meinl, E., Krumbholz, M., and Hohlfeld, R. (2006). B lineage cells in the inflammatory central nervous system environment: migration, maintenance, local antibody production, and therapeutic modulation. *Annals of neurology* 59, 880-892.
- Midorikawa, Y., Tsutsumi, S., Taniguchi, H., Ishii, M., Kobune, Y., Kodama, T., Makuuchi, M., and Aburatani, H. (2002). Identification of genes associated with dedifferentiation of hepatocellular carcinoma with expression profiling analysis. *Japanese journal of cancer research : Gann* 93, 636-643.
- Miller, S.D., Karpus, W.J., and Davidson, T.S. (2007). Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in the Mouse. *Current protocols in immunology / edited by John E Coligan [et al] Chapter*, Unit-15.11.
- Moebius, U., Kober, G., Griscelli, A.L., Hercend, T., and Meuer, S.C. (1991). Expression of different CD8 isoforms on distinct human lymphocyte subpopulations. *European journal of immunology* 21, 1793-1800.
- Moller, A.T., Backstrom, T., Nyberg, S., Sondergaard, H.P., and Helstrom, L. (2016). Women with PTSD have a changed sensitivity to GABA-A receptor active substances. *Psychopharmacology* 233, 2025-2033.
- Nath, U., and Grant, R. (1997). Neurological paraneoplastic syndromes. *Journal of Clinical Pathology* 50, 975-980.
- Neefjes, J., Jongsma, M.L.M., Paul, P., and Bakke, O. (2011). Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nature Reviews Immunology* 11, 823.
- Newman, M.P., Blum, S., Wong, R.C., Scott, J.G., Prain, K., Wilson, R.J., and Gillis, D. (2016). Autoimmune encephalitis. *Intern Med J* 46, 148-157.
- Nikolich-Zugich, J., Slifka, M.K., and Messaoudi, I. (2004). The many important facets of T-cell repertoire diversity. *Nature reviews Immunology* 4, 123-132.
- Noppen, C., Schaefer, C., Zajac, P., Schutz, A., Kocher, T., Kloth, J., Heberer, M., Colonna, M., De Libero, G., and Spagnoli, G.C. (1998). C-type lectin-like receptors in peptide-specific HLA class I-restricted cytotoxic T lymphocytes: differential expression and modulation of effector functions in clones sharing identical TCR structure and epitope specificity. *European journal of immunology* 28, 1134-1142.
- Norment, A.M., and Littman, D.R. (1988). A second subunit of CD8 is expressed in human T cells. *The EMBO journal* 7, 3433-3439.
- Nosadini, M., Mohammad, S.S., Corazza, F., Ruga, E.M., Kothur, K., Perilongo, G., Frigo, A.C., Toldo, I., Dale, R.C., and Sartori, S. (2017). Herpes simplex virus-induced anti-N-methyl-d-aspartate receptor encephalitis: a systematic literature review with analysis of 43 cases. *Developmental medicine and child neurology* 59, 796-805.
- Nossal, G.J. (1994). Negative selection of lymphocytes. *Cell* 76, 229-239.
- Notredame, C., Higgins, D.G., and Heringa, J. (2000). T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J Mol Biol* 302, 205-217.

- Nuss, P. (2015). Anxiety disorders and GABA neurotransmission: a disturbance of modulation. *Neuropsychiatric disease and treatment* 11, 165-175.
- O'Callaghan, C.A. (2000). Molecular basis of human natural killer cell recognition of HLA-E (human leucocyte antigen-E) and its relevance to clearance of pathogen-infected and tumour cells. *Clinical science (London, England : 1979)* 99, 9-17.
- O'Callaghan, C.A., and Bell, J.I. (1998). Structure and function of the human MHC class Ib molecules HLA-E, HLA-F and HLA-G. *Immunological reviews* 163, 129-138.
- O'Connor, G.M., Hart, O.M., and Gardiner, C.M. (2006). Putting the natural killer cell in its place. *Immunology* 117, 1-10.
- O'Connor, K.C., Bar-Or, A., and Hafler, D.A. (2001). The neuroimmunology of multiple sclerosis: possible roles of T and B lymphocytes in immunopathogenesis. *Journal of clinical immunology* 21, 81-92.
- Ohkawa, T., Satake, S., Yokoi, N., Miyazaki, Y., Ohshita, T., Sobue, G., Takashima, H., Watanabe, O., Fukata, Y., and Fukata, M. (2014). Identification and characterization of GABA(A) receptor autoantibodies in autoimmune encephalitis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 34, 8151-8163.
- Oldstone, M.B. (1987). Molecular mimicry and autoimmune disease. *Cell* 50, 819-820.
- Oldstone, M.B. (2014). Molecular mimicry: its evolution from concept to mechanism as a cause of autoimmune diseases. *Monoclonal antibodies in immunodiagnosis and immunotherapy* 33, 158-165.
- Pannemans, K., Broux, B., Goris, A., Dubois, B., Broekmans, T., Van Wijmeersch, B., Geraghty, D., Stinissen, P., and Hellings, N. (2014). HLA-E restricted CD8+ T cell subsets are phenotypically altered in multiple sclerosis patients. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)* 20, 790-801.
- Panzer, J.A., and Lyons, J.A. (2016). Autoimmune encephalitis in the age of neuronal surface antigens. *Neurology* 87, 1428-1429.
- Pegram, H.J., Andrews, D.M., Smyth, M.J., Darcy, P.K., and Kershaw, M.H. (2011). Activating and inhibitory receptors of natural killer cells. *Immunology and cell biology* 89, 216-224.
- Pelosof, L.C., and Gerber, D.E. (2010). Paraneoplastic syndromes: an approach to diagnosis and treatment. *Mayo Clinic proceedings* 85, 838-854.
- Perussia, B., Fanning, V., and Trinchieri, G. (1983). A human NK and K cell subset shares with cytotoxic T cells expression of the antigen recognized by antibody OKT8. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 131, 223-231.
- Petit-Pedrol, M., Armangue, T., Peng, X., Bataller, L., Cellucci, T., Davis, R., McCracken, L., Martinez-Hernandez, E., Mason, W.P., Kruer, M.C., *et al.* (2014). Encephalitis with refractory seizures, status epilepticus, and antibodies to the GABAA receptor: a case series, characterisation of the antigen, and analysis of the effects of antibodies. *The Lancet Neurology* 13, 276-286.
- Picelli, S., Faridani, O.R., Bjorklund, A.K., Winberg, G., Sagasser, S., and Sandberg, R. (2014). Full-length RNA-seq from single cells using Smart-seq2. *Nat Protoc* 9, 171-181.
- Plappert, A. (2016). Analysis of Disease-Related T Cell Receptors and their Antigens in GABA<sub>A</sub> Receptor Encephalitis. In *Institut für Klinische Neuroimmunologie (Ludwig-Maximilians-Universität München)*.
- Polman, C.H., Reingold, S.C., Banwell, B., Clanet, M., Cohen, J.A., Filippi, M., Fujihara, K., Havrdova, E., Hutchinson, M., Kappos, L., *et al.* (2011). Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald criteria. *Annals of neurology* 69, 292-302.
- Probst-Kepper, M., Stroobant, V., Kridel, R., Gaugler, B., Landry, C., Brasseur, F., Cosyns, J.P., Weynand, B., Boon, T., and Van Den Eynde, B.J. (2001). An alternative open reading frame of the human macrophage colony-stimulating factor gene is independently translated and codes for an antigenic peptide of 14 amino acids recognized by tumor-infiltrating CD8 T lymphocytes. *J Exp Med* 193, 1189-1198.
- Pruss, H., Finke, C., Holtje, M., Hofmann, J., Klingbeil, C., Probst, C., Borowski, K., Ahnert-Hilger, G., Harms, L., Schwab, J.M., *et al.* (2012). N-methyl-D-aspartate receptor antibodies in herpes simplex encephalitis. *Annals of neurology* 72, 902-911.

- Rauer, S., Stork, L., Urbach, H., Stathi, A., Marx, A., Suss, P., Prinz, M., Bruck, W., and Metz, I. (2018). Drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms after daclizumab therapy. *Neurology* 91, e359-e363.
- Raulet, D.H. (2003). Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nature reviews Immunology* 3, 781-790.
- Rühl, G. (2016). Untersuchungen zur Antigenerkennung von T-Zellen bei Patienten mit Autoimmunkrankheiten (Ludwig-Maximilians-Universität München).
- Rühl, G., Niedl, A.G., Patronov, A., Siewert, K., Pinkert, S., Kalemánov, M., Friese, M.A., Attfield, K.E., Antes, I., Hohlfeld, R., *et al.* (2016). Multiple sclerosis: Molecular mimicry of an antimyelin HLA class I restricted T-cell receptor. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 3, e241.
- Saxena, A., Martin-Blondel, G., Mars, L.T., and Liblau, R.S. (2011). Role of CD8 T cell subsets in the pathogenesis of multiple sclerosis. *FEBS letters* 585, 3758-3763.
- Schein, F., Gagneux-Brunon, A., Antoine, J.C., Lavernhe, S., Pillet, S., Paul, S., Fresard, A., Boutet, C., Grange, R., Cazorla, C., *et al.* (2017). Anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis after Herpes simplex virus-associated encephalitis: an emerging disease with diagnosis and therapeutic challenges. *Infection* 45, 545-549.
- Schleinitz, N., Vely, F., Harle, J.R., and Vivier, E. (2010). Natural killer cells in human autoimmune diseases. *Immunology* 131, 451-458.
- Schmeichel, K.L., and Beckerle, M.C. (1997). Molecular dissection of a LIM domain. *Molecular Biology of the Cell* 8, 219-230.
- Schou, M., Saether, S.G., Borowski, K., Teegen, B., Kondziella, D., Stoecker, W., Vaaler, A., and Reitan, S.K. (2016). Prevalence of serum anti-neuronal autoantibodies in patients admitted to acute psychiatric care. *Psychol Med* 46, 3303-3313.
- Schou, M.B., Saether, S.G., Drange, O.K., Brenner, E., Crespi, J., Eikenes, L., Mykland, M.S., Pintzka, C., Haberg, A.K., Sand, T., *et al.* (2019). A prospective three-year follow-up study on the clinical significance of anti-neuronal antibodies in acute psychiatric disorders. *Sci Rep* 10, 35.
- Schou, M.B., Saether, S.G., Drange, O.K., Krane-Gartiser, K., Reitan, S.K., Vaaler, A.E., and Kondziella, D. (2018). The significance of anti-neuronal antibodies for acute psychiatric disorders: a retrospective case-controlled study. *BMC neuroscience* 19, 68.
- Selter, R.C., and Hemmer, B. (2013). Update on immunopathogenesis and immunotherapy in multiple sclerosis. *ImmunoTargets and Therapy* 2, 21-30.
- Sharma, G., and Holt, R.A. (2014). T-cell epitope discovery technologies. *Human immunology* 75, 514-519.
- Shawar, S.M., Vyas, J.M., Rodgers, J.R., and Rich, R.R. (1994). Antigen presentation by major histocompatibility complex class I-B molecules. *Annual review of immunology* 12, 839-880.
- Siewert, K. (2011). Autoaggressive Human T Cell Receptors and their Antigen Specificities (Ludwig-Maximilians-Universität München).
- Siewert, K., Malotka, J., Kawakami, N., Wekerle, H., Hohlfeld, R., and Dornmair, K. (2012). Unbiased identification of target antigens of CD8+ T cells with combinatorial libraries coding for short peptides. *Nat Med* 18, 824-828.
- Simpson, S., Taylor, B.V., and van der Mei, I. (2015). The role of epidemiology in MS research: Past successes, current challenges and future potential. *Multiple Sclerosis Journal* 21, 969-977.
- Sinha, S., Boyden, A.W., Itani, F.R., Crawford, M.P., and Karandikar, N.J. (2015). CD8(+) T-Cells as Immune Regulators of Multiple Sclerosis. *Frontiers in immunology* 6, 619.
- Sinha, S., Itani, F.R., and Karandikar, N.J. (2014). Immune regulation of multiple sclerosis by CD8+ T cells. *Immunologic research* 59, 254-265.
- Skulina, C., Babbe, H., Schmidt, S., Dornmair, K., Roers, A., Rajewsky, K., Wekerle, H., Hohlfeld, R., and Goebels, N. (2004). Multiple sclerosis: brain-infiltrating CD8+ T cells persist as clonal expansions in the cerebrospinal fluid and blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 2428-2433.
- Spatola, M., Petit-Pedrol, M., Simabukuro, M.M., Armangue, T., Castro, F.J., Barcelo Artigues, M.I., Julia Benique, M.R., Benson, L., Gorman, M., Felipe, A., *et al.* (2017). Investigations in GABAA receptor antibody-associated encephalitis. *Neurology* 88, 1012-1020.

- Sullivan, L.C., Clements, C.S., Beddoe, T., Johnson, D., Hoare, H.L., Lin, J., Huyton, T., Hopkins, E.J., Reid, H.H., Wilce, M.C., *et al.* (2007). The heterodimeric assembly of the CD94-NKG2 receptor family and implications for human leukocyte antigen-E recognition. *Immunity* 27, 900-911.
- Sykulev, Y., Joo, M., Vturina, I., Tsomides, T.J., and Eisen, H.N. (1996). Evidence that a single peptide-MHC complex on a target cell can elicit a cytolytic T cell response. *Immunity* 4, 565-571.
- Takei, F., McQueen, K.L., Maeda, M., Wilhelm, B.T., Lohwasser, S., Lian, R.H., and Mager, D.L. (2001). Ly49 and CD94/NKG2: developmentally regulated expression and evolution. *Immunological reviews* 181, 90-103.
- Tennakoon, D.K., Mehta, R.S., Ortega, S.B., Bhoj, V., Racke, M.K., and Karandikar, N.J. (2006). Therapeutic induction of regulatory, cytotoxic CD8+ T cells in multiple sclerosis. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 176, 7119-7129.
- Thellin, O., Zorzi, W., Lakaye, B., De Borman, B., Coumans, B., Hennen, G., Grisar, T., Igout, A., and Heinen, E. (1999). Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *Journal of biotechnology* 75, 291-295.
- Thompson, E.J., Kaufmann, P., Shortman, R.C., Rudge, P., and McDonald, W.I. (1979). Oligoclonal immunoglobulins and plasma cells in spinal fluid of patients with multiple sclerosis. *British Medical Journal* 1, 16-17.
- Tilloy, F., Treiner, E., Park, S.H., Garcia, C., Lemonnier, F., de la Salle, H., Bendelac, A., Bonneville, M., and Lantz, O. (1999). An invariant T cell receptor alpha chain defines a novel TAP-independent major histocompatibility complex class Ib-restricted alpha/beta T cell subpopulation in mammals. *J Exp Med* 189, 1907-1921.
- Treiner, E., Duban, L., Bahram, S., Radosavljevic, M., Wanner, V., Tilloy, F., Affaticati, P., Gilfillan, S., and Lantz, O. (2003). Selection of evolutionarily conserved mucosal-associated invariant T cells by MR1. *Nature* 422, 164-169.
- Tyler, A.F., Mendoza, J.P., Firan, M., and Karandikar, N.J. (2013). CD8(+) T Cells Are Required For Glatiramer Acetate Therapy in Autoimmune Demyelinating Disease. *PLoS One* 8, e66772.
- Vales-Gomez, M., Reyburn, H.T., Erskine, R.A., Lopez-Botet, M., and Strominger, J.L. (1999). Kinetics and peptide dependency of the binding of the inhibitory NK receptor CD94/NKG2-A and the activating receptor CD94/NKG2-C to HLA-E. *The EMBO journal* 18, 4250-4260.
- van der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., De Plaen, E., Van den Eynde, B., Knuth, A., and Boon, T. (1991). A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science (New York, NY)* 254, 1643-1647.
- van der Merwe, P.A., and Dushek, O. (2011). Mechanisms for T cell receptor triggering. *Nature reviews Immunology* 11, 47-55.
- Vyas, J.M., Van der Veen, A.G., and Ploegh, H.L. (2008). The known unknowns of antigen processing and presentation. *Nature reviews Immunology* 8, 607-618.
- Wada, H., Matsumoto, N., Maenaka, K., Suzuki, K., and Yamamoto, K. (2004). The inhibitory NK cell receptor CD94/NKG2A and the activating receptor CD94/NKG2C bind the top of HLA-E through mostly shared but partly distinct sets of HLA-E residues. *European journal of immunology* 34, 81-90.
- Wang, S.J., Wang, P.Z., Gale, R.P., Qin, Y.Z., Liu, Y.R., Lai, Y.Y., Jiang, H., Jiang, Q., Zhang, X.H., Jiang, B., *et al.* (2017). Cysteine and glycine-rich protein 2 (CSRP2) transcript levels correlate with leukemia relapse and leukemia-free survival in adults with B-cell acute lymphoblastic leukemia and normal cytogenetics. *Oncotarget* 8, 35984-36000.
- Weaver, K.M.C. (2017). *Janeway's Immunobiology*.
- Wei, X.H., and Orr, H.T. (1990). Differential expression of HLA-E, HLA-F, and HLA-G transcripts in human tissue. *Human immunology* 29, 131-142.
- Weiskirchen, R., and Gunther, K. (2003). The CRP/MLP/TLP family of LIM domain proteins: acting by connecting. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 25, 152-162.
- Weiskirchen, R., Moser, M., Weiskirchen, S., Erdel, M., Dahmen, S., Buettner, R., and Gressner, A.M. (2001). LIM-domain protein cysteine- and glycine-rich protein 2 (CRP2) is a novel marker of hepatic

- stellate cells and binding partner of the protein inhibitor of activated STAT1. *The Biochemical journal* 359, 485-496.
- Weiskirchen, R., Pino, J.D., Macalma, T., Bister, K., and Beckerle, M.C. (1995). The cysteine-rich protein family of highly related LIM domain proteins. *J Biol Chem* 270, 28946-28954.
- Weiss, A. (1991). Molecular and genetic insights into T cell antigen receptor structure and function. *Annual review of genetics* 25, 487-510.
- Wenzel, T., Eckerskorn, C., Lottspeich, F., and Baumeister, W. (1994). Existence of a molecular ruler in proteasomes suggested by analysis of degradation products. *FEBS letters* 349, 205-209.
- Winkel, K., Sotzik, F., Vremec, D., Cameron, P.U., and Shortman, K. (1994). CD4 and CD8 expression by human and mouse thymic dendritic cells. *Immunology letters* 40, 93-99.
- Wooldridge, L., Ekeruche-Makinde, J., van den Berg, H.A., Skowera, A., Miles, J.J., Tan, M.P., Dolton, G., Clement, M., Llewellyn-Lacey, S., Price, D.A., *et al.* (2012). A single autoimmune T cell receptor recognizes more than a million different peptides. *J Biol Chem* 287, 1168-1177.
- Wooldridge, L., van den Berg, H.A., Glick, M., Gostick, E., Laugel, B., Hutchinson, S.L., Milicic, A., Brenchley, J.M., Douek, D.C., Price, D.A., *et al.* (2005). Interaction between the CD8 Coreceptor and Major Histocompatibility Complex Class I Stabilizes T Cell Receptor-Antigen Complexes at the Cell Surface. *J Biol Chem* 280, 27491-27501.
- Wu, J., Song, Y., Bakker, A.B., Bauer, S., Spies, T., Lanier, L.L., and Phillips, J.H. (1999). An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science (New York, NY)* 285, 730-732.
- Wucherpfennig, K.W. (2001). Mechanisms for the induction of autoimmunity by infectious agents. *The Journal of clinical investigation* 108, 1097-1104.
- Wucherpfennig, K.W., Newcombe, J., Li, H., Keddy, C., Cuzner, M.L., and Hafler, D.A. (1992). Gamma delta T-cell receptor repertoire in acute multiple sclerosis lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 4588-4592.
- Wucherpfennig, K.W., and Strominger, J.L. (1995). Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell* 80, 695-705.
- Wun, K.S., Cameron, G., Patel, O., Pang, S.S., Pellicci, D.G., Sullivan, L.C., Keshipeddy, S., Young, M.H., Uldrich, A.P., Thakur, M.S., *et al.* (2011). A molecular basis for the exquisite CD1d-restricted antigen specificity and functional responses of natural killer T cells. *Immunity* 34, 327-339.
- Young, M.H., U'Ren, L., Huang, S., Mallevaey, T., Scott-Browne, J., Crawford, F., Lantz, O., Hansen, T.H., Kappler, J., Marrack, P., *et al.* (2013). MAIT cell recognition of MR1 on bacterially infected and uninfected cells. *PLoS One* 8, e53789.

## Anhang

### Ergänzende Tabellen

**Tabelle x1: Annealing Temperatur und Zyklusanzahl bei der Multiplex-RT-PCR**

Probe	Annealing Temperatur in °C	Zyklusanzahl
Tonsillen RNA, 1:30	57	20
RNA Hirnschnitt Patient A, 10A, 1:100	55	28
RNA Hirnschnitt Patient A, 10A-2, 1:100	57	28
RNA Hirnschnitt Patient A, 12b, 1:100	57	28
β-Aktin Test (10A-2, 1:100)	57	28
LMD-isolierte-Zellpools	57	28

**Tabelle x2: Annealing Temperatur und Zyklusanzahl bei der semi-nested PCR**

Probe	Annealing Temperatur in °C	Zyklusanzahl
Tonsillen RNA, 1:30	57	30
NKG2C, 2. Test, Tonsillen RNA, 1:30	55	30
RNA Hirnschnitt Patient A, 10A	57 (CD94, Infγ, IL-10, CD3d), 55 für den Rest	35
RNA Hirnschnitt Patient A, 10A-2, 1:100	55 (NKG2C, E, H), 57 für den Rest	35
RNA Hirnschnitt Patient A, 12b, 1:100	55 (NKG2C, E, H), 57 für den Rest	35
β-Aktin Test (10A-2, 1:100)	57	35
LMD-isolierte-Zellpools	55 (NKG2C, E, H), 57 für den Rest	35 bzw. 45



## Auflistung von Abbildungen und Tabellen

Abbildung 1: Darstellung der Interaktion einer APZ mit einer T-Zelle über den MHC-Peptid-Komplex und den TZR	2
Abbildung 2: Schematischer Aufbau der beiden MHC-Proteine	4
Abbildung 3: Darstellung der Antigenpräsentation über das MHC-I-Molekül	5
Abbildung 4: GABA <sub>A</sub> -R-Struktur und Aufbau aus Untereinheiten	9
Abbildung 5: Darstellung der Immunpathogenese und der beteiligten Zellen bei MS	12
Abbildung 6: Vereinfachte schematische Darstellung verschiedener NKG2-Moleküle und ihrer Liganden	14
Abbildung 7: Schematische Darstellung des Ablaufs des Experiments sowie der Isolierung von Zellen mittels einer Kapillare	18
Abbildung 8: Übersicht über den Ablauf des Experiments mit LCM isolierten Zellen	44
Abbildung 9: Darstellung des Durchlichtkanals	56
Abbildung 10: Immunhistochemische Doppelfärbung von CD94 <sup>+</sup> und CD8α <sup>+</sup> Zellen in Hirnschnitten von Patient A	57
Abbildung 11: Mikrodissektion einer Zelle im Durchlichtkanal	58
Abbildung 12: Test der Primer an RNA aus Tonsillengewebe	58
Abbildung 13: Durchflusszytometrische Analyse der CD3 und CD8 Expression dreier IP2 Klone	62
Abbildung 14: CD3-Aktivierung von IP2 Klon 11 unter dem Fluoreszenzmikroskop	63
Abbildung 15: Vergleich der Aktivierbarkeit dreier reklonierter Klone von IP2 Klon 11 unter dem Fluoreszenzmikroskop	64
Abbildung 16: Vergleich der Aktivierbarkeit von drei Reklonierungen von IP2 Klon 11 mit dem ursprünglichen Klon 11 in der Durchflusszytometrie	65
Abbildung 17: Negativkontrollen von Klon 11 und Klon 4 (rekloniert)	66
Abbildung 18: Durchflusszytometrische Analyse der IP2-Zellen mit einem APC-markierten CD3-Antikörper im Vergleich zur Isotyp-Kontrolle	67
Abbildung 19: Durchflusszytometrische Analyse der IP2-Zellen mit einem APC-markierten CD8-Antikörper im Vergleich zur Isotyp-Kontrolle	68
Abbildung 20: Getrennt isolierte Zellpopulationen von verschiedenen T-Hybridom-Klonen und ihre sGFP-Expression	69
Abbildung 21: Vergleich der Transfektionseffizienz mittels FuGENE® und Nukleofektion	70
Abbildung 22: Transfektionsergebnis mit der SF Lösung	72
Abbildung 23: Durchflusszytometrische Analyse der Transfektion von ptt5 sGFP sowie RSV sGFP	73
Abbildung 24: Vergleich der Transfektionseffizienz des RSV Vektors mit der des ptt5 Vektors anhand der sGFP-Expression	74
Abbildung 25: Durchflusszytometrische Analyse zweier Kokulturen von LCL-Zellen mit T-Hybridomen	75
Abbildung 26: Darstellung eines 4er Clusters	77
Abbildung 27: Darstellung eines 4er Clusters vor und nach der Isolierung der APZ mittels Glaskapillare	78
Abbildung 28: Darstellung des Screeningzeitpunktes 48 h nach Transfektion der Kandidaten	81
Abbildung 29: CD8 <sup>+</sup> -T-Zellen – pathogener Spieler oder Regulator der MS?	89
Tabelle 1: Übersicht über die verschiedenen NKG2-Subtypen, ihre Funktion und Besonderheiten	13
Tabelle 2: Verwendete Geräte	21
Tabelle 3: Puffer und Lösungen	23
Tabelle 4: Verwendete Primer und ihrer Nukleotidsequenz nach Anwendungsgebieten	24
Tabelle 5: Sonstiges Material für PCRs und RTs	26
Tabelle 6: Verwendete Software	26
Tabelle 7: Für die Durchflusszytometrie verwendete Antikörper	27
Tabelle 8: Für die Immunhistochemie verwendete Antikörper	27
Tabelle 9: Verwendete Plasmide	28
Tabelle 10: Verwendete Kits und Reagenzien	29
Tabelle 11: HLA-Typisierung von IP2	30
Tabelle 12: Selektionsantibiotika und selektierte Strukturen sowie finale Konzentration im Medium	32

## Anhang

Tabelle 13: Name der LCL-Zelllinie und HLA-Typisierung sowie GFP-Expressionsprofil	35
Tabelle 14: Zusammensetzung der Reagenzien für die immunhistochemische Färbung von CD94 und CD8 $\alpha$	43
Tabelle 15: Im Rahmen der Multiplex-RT-PCR untersuchte Transkripte	48
Tabelle 16: Ergebnis der Sequenzanalyse der Produkte von Tonsillen RNA	59
Tabelle 17: Gegenüberstellung der Genexpressionsmuster in verschiedenen RNA-Proben von Patient A und in Tonsillen RNA unter Angabe der jeweiligen Verdünnung	60
Tabelle 18: Prozentuale Anteile spontanaktiver Zellen bei verschiedenen Klonen zu einem Untersuchungszeitpunkt	67
Tabelle 19: Primär isolierte APZ nach HLA-Molekül und Art der PECP-Bibliothek sowie jeweils gescreente Fläche und Cluster pro cm <sup>2</sup>	79
Tabelle 20: Zusammenstellung der zur Retransfektion verwendeten Pools	80
Anhang:	
Tabelle x1: Annealing Temperatur und Zyklusanzahl bei der Multiplex-RT-PCR	108
Tabelle x2: Annealing Temperatur und Zyklusanzahl bei der semi-nested PCR	108



**Eidesstattliche Versicherung**

Amft, Michaela

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel „**Charakterisierung von T-Zellen und T-Zell-Rezeptoren bei entzündlichen neurologischen Erkrankungen**“

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 28.02.2021

Ort, Datum

Michaela Amft

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand